

**Desoxyribonucleotid-
und DNA-Synthese in den dikotylen Pflanzen
VICIA FABA und GLYCINE MAX**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Bernd Hovemann
aus Bad Rothenfelde**

Marburg/Lahn 1976

**Desoxyribonucleotid-
und DNA-Synthese in den dikotylen Pflanzen
VICIA FABA und GLYCINE MAX**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Bernd Hovemann
aus Bad Rothenfelde**

Marburg/Lahn 1976



Vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 01. 12. 76

Tag der mündlichen Prüfung 15. 12. 76

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen.....	3
1. <u>Einleitung</u>	
1.1. Nucleinsäuren und Nucleinsäure- biosynthese.....	5
1.2. Enzyme der Desoxyribonucleotid- Synthese.....	7
1.3. DNA-Polymerasen.....	10
1.4. DNA-Bildung in Pflanzen: Ziel- setzung dieser Arbeit.....	12
2. <u>Experimenteller Teil</u>	
2.1. Pflanzenmaterial.....	14
2.2. Allgemeine Methoden.....	15
2.3. Enzymtests.....	19
2.4. DNA-Markierung.....	23
2.5. Chromatographische Verfahren....	24
2.6. Gewinnung und Eigenschaften von Zellsuspensionskulturen.....	26
2.7. Reagentien und andere Materia- lien.....	28
3. <u>Ribonucleotidreduktion und DNA- Synthese in Vicia faba und Glycine max</u>	
3.1. Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Vicia faba und Glycine max...	30
3.1.1. Nachweis der Enzymaktivität in Vicia faba.....	31

3.1.2.	Versuche zur Enzymanreicherung..	36
3.1.3.	Ribonucleotidreduktase in Glycine max.....	40
3.1.4.	DNA-Markierung durch Cytidin....	43
3.2.	Ein modifiziertes Nucleotid - Zwischenprodukt oder Nebenpro- dukt?.....	48
3.3.	DNA-Polymerase	
3.3.1.	Nachweis und Zeitabhängigkeit...	55
3.3.2.	Eigenschaften und Spezifität der Enzyme.....	59
3.4.	Konkurrenzreaktionen.....	66
4.	<u>Analytik der Ribonucleotidreduk- tase-Aktivität.....</u>	69
5.	<u>Diskussion</u>	
5.1.	Die Ribonucleotidreduktion in Pflanzen.....	79
5.2.	DNA-Synthese in Pflanzen.....	86
6.	<u>Zusammenfassung.....</u>	89
7.	<u>Literatur.....</u>	91

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Absorption
Ado, dAdo	Adenosin, Desoxyadenosin
AMP (ADP,	Adenosin-5'-phosphat (-di,-triphosphat)
ATP)	
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
Base	allgemeiner Ausdruck für heterocyclische Base in der Nucleinsäure
Beckman M 71	- Kationenaustauscher
Ci	Curie = $2,22 \times 10^{12}$ dpm
cpm	"counts" (Zählimpulse) pro Minute
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit dem Atomgewicht 14
Cyd, dCyd	Cytidin, Desoxycytidin
Cyt	Cytosin
CMP (CDP,	Cytidin-5'-phosphat (-di,-triphosphat)
CTP)	
dCMP (dCDP,	Desoxycytidin-5'-phosphat (-di,-triphosphat)
dCTP)	
3',5'-cyclo-CMP	Cytidin-3',5'-cyclophosphat
Dowex 50	Kationenaustauscher
DNase	Desoxyribonuclease (EC 3.1.4.5.)
dpm	"desintegrations" (Zerfälle) pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E_{260}	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
Guo, dGuo	Guanosin, Desoxyguanosin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat

^3H	radioaktives Wasserstoffisotop mit dem Atomgewicht 3
μ	mikro, $\times 10^{-6}$
MG	Molekulargewicht
mt-Enzym	mitochondrielles Enzym
n	nano, $\times 10^{-9}$
N,dN	Nucleosid, Desoxynucleosid
NMP,dNMP	Nucleosidmonophosphat, Desoxynucleosidmonophosphat
NDP,dNDP	Nucleosiddiphosphat, Desoxynucleosiddiphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
p	pico, $\times 10^{-12}$
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Di-2(5-phenyloxazolyl)benzol
pcv	packed cell volume
PEI-Cellulose	Polyäthylenimin-Cellulose
RNase A	Pankreas-Ribonuclease A (EC 2.7.7.16)
rpm	Umdrehungen pro Minute
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
S30,S100	30000 bzw. 100000g-Überstände
SDS	Natriumdodecylsulfat
^{35}S	radioaktives Schwefelisotop mit dem Atomgewicht 35
Std	Stunden
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
Urd,dUrd	Uridin, Desoxyuridin
UMP,UDP	Uridin-5'-phosphat, -diphosphat
Ura	Uracil

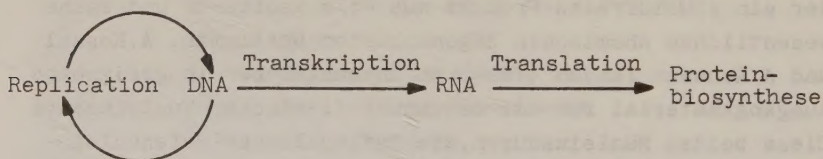
1. Einleitung

1.1. Nucleinsäuren und Nucleinsäurebiosynthese

Etwa hundert Jahre nach ihrer Entdeckung durch F. Miescher (1869) nehmen die Nucleinsäuren unbestritten eine Schlüsselposition unter den verschiedenen Bausteinen der Zelle ein. Sie stehen im Mittelpunkt einer relativ jungen wissenschaftlichen Fachrichtung, der Molekularbiologie, deren Entstehung und Ausweitung durch sie stimuliert wurde. Dieses Gebiet der Chemie und Biologie makromolekularer Zellsubstanzen befaßt sich mit den grundlegenden Problemen, die das Phänomen "Leben" aufwirft, wie die Vererbung, Regulation und Differenzierung der Zellfunktionen oder die Wirkungsweise der Enzyme.

Der Name Nucleinsäure wurde von R. Altmann (1889) geprägt, der ein eiweißfreies Produkt aus Hefe isolierte und seine wesentlichen chemischen Eigenschaften bestimmte. A. Kossel und A. Naumann fanden (1894) im Thymusgewebe ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Gewinnung tierischer Nucleinsäure. Diese beiden Nucleinsäuren, die "pflanzliche" Hefenucleinsäure und die tierische Thymusnucleinsäure galten mehr als dreißig Jahre als die wichtigsten Vertreter ihrer Substanzklasse. Bemerkenswert erscheint die damalige Einteilung in Nucleinsäure aus tierischem Gewebe mit den Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, Desoxyribose und Phosphorsäure (DNA) und Nucleinsäure aus Pflanzen mit den Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil sowie Ribose und Phosphorsäure als Bausteine (RNA): Die Desoxyribonucleinsäure ist in Pflanzen anfangs gar nicht bemerkt worden - ein Hinweis auf die Schwierigkeiten, die bei der DNA-Präparation aus pflanzlichem Gewebe auftreten können. Den Beweis für die Rolle der Nucleinsäure als Erbsubstanz erbrachten die Transformationsversuche von

Avery et al. (1944) an Pneumokokken. Mit dem Modell der komplementären, doppelsträngigen Struktur der DNA, Watson und Crick (1953), war dann der entscheidende Durchbruch zum Verständnis des Vererbungsmechanismus gelungen. Aus dem Prinzip der Basenpaarung ließ sich das Schema der semikonservativen Verdopplung ableiten, das in den Versuchen von Meselson und Stahl (1958) an der DNA aus *Escherichia coli*, die auf ^{15}N -haltigem und dann auf ^{14}N -haltigem Medium gewachsen war, experimentell bestätigt wurde. Die in der DNA gespeicherte Information kann so repliziert werden; sie muß aber auch in der Zelle wirksam gemacht werden können, z.B. die Bildung der Proteine determinieren. Dieser Beziehung zwischen DNA und Protein trug Crick mit seinem "zentralen Dogma" Rechnung, das den Fluß der Information für die Bildung zelleigener Proteine von DNA über RNA zum Protein fordert:



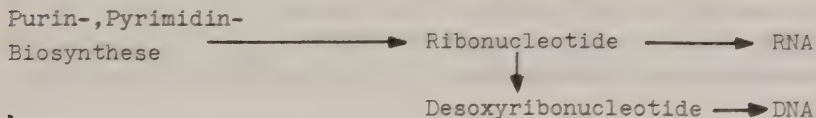
Die Erkenntnis dieser Zusammenhänge führte zu einer außerordentlichen Stimulierung der Nucleinsäureforschung. Zu den Themen, die schon früh in Angriff genommen wurden, gehören der Mechanismus der DNA-Replikation, die Wirkungsweise der RNA-spaltenden Enzyme oder der Ablauf der Proteinbiosynthese, die heute bei Bakterien in den Grundzügen aufgeklärt worden ist¹.

Neben diesen Schwerpunkten der molekularbiologischen Forschung ist die Biosynthese der Nucleinsäure-Vorläufer (Purin- und Pyrimidinnucleotide) ein nicht weniger bedeutender, aber bei weitem nicht so intensiv studierter Aspekt.

So wird die für die DNA-Replikation notwendige Bildung von Desoxyribonucleotiden aus Ribonucleotiden zwar seit langem in den Arbeitsgruppen von Reichard², Blakley³ und Moore⁴ untersucht, doch erst in den letzten Jahren gilt diesen Enzymen ein allgemeineres Interesse. Diese Arbeit befaßt sich mit zwei der wichtigsten Enzymaktivitäten der DNA-Replikation - Ribonucleotidreduktion und DNA-Polymerisation - in Pflanzenzellen (s. 1.4.). Sie werden im folgenden näher beschrieben.

1.2. Enzyme der Desoxyribonucleotidsynthese

2'-Desoxyribonucleotide sind in der Zelle nur in äußerst geringer Konzentration vorhanden. Man fand in Zellkulturen der Maus, des Hamsters und in Ascites-Tumorzellen 10 - 100 pmol dNTP/10⁶ Zellen⁵⁻⁷. Damit kann die DNA-Replikation nur wenige Minuten unterhalten werden. Für die Bereitstellung weiterer Desoxyribonucleotide kommt der "salvage pathway" ("preformed pathway") oder eine de novo-Biosynthese in Frage. Es werden aber in der Regel außer von auxotrophen Mikroorganismen oder von manchen Tumorgeweben kaum Desoxyribonucleotide aus DNA wiederverwertet. Die de novo-Biosynthese führt über die Ribonucleotide, deren Riboseanteil erst auf der Nucleotidstufe reduziert wird. Dieser Syntheseweg ist durch in vivo-Markierungsexperimente gesichert⁸⁻¹¹. Sie zeigen eindeutig, daß Cytidin (aber nicht die Base Cytosin) für RNA- und DNA-Synthese verwertet wird; z.B. fanden Rose und Schweigert bei Angebot von Cytidin, das in Ribose- und Basenanteil radioaktiv markiert war, die spezifische Aktivität von Ribose und Desoxyribose in RNA bzw. DNA in unveränderten Verhältnis zu der der Pyrimidinbase des angebotenen Nucleosids.



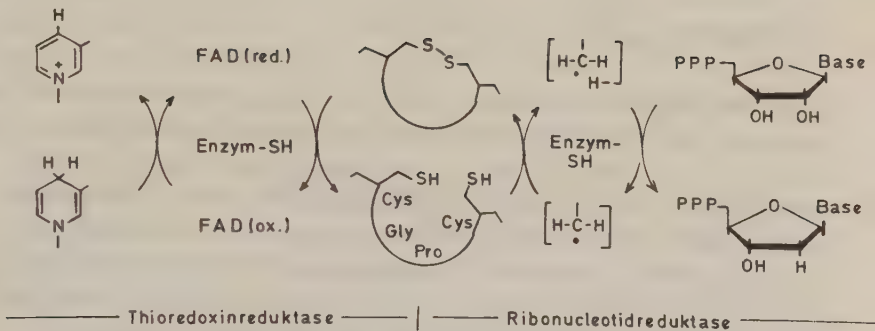
Entscheidende Enzyme für die Unterhaltung der DNA-Synthese sind damit die Ribonucleotidreduktasen (EC 1.17.4.), die Ribonucleosid-5'-phosphate unter Ersatz der 2'-Hydroxylgruppe durch Wasserstoff zu 2'-Desoxyribonucleotiden reduzieren. Reduktionsmittel sind in allen bekannten Fällen Dithiole, die dabei ins Disulfid übergehen und in einer weiteren Enzymreaktion über ein Flavinenzym durch NADPH regeneriert werden. Dieser Reduktionsmechanismus ist zuerst in *E.coli* von Reichard gefunden worden; er hat dafür den Begriff des Thioedoxinsystems geprägt^{12,13}.

Man unterscheidet generell zwei Arten von Ribonucleotidreduktasen, die in *E.coli* und *Lactobacillus leichmannii* am besten untersucht sind. Das *E.coli*-Enzym¹⁴ repräsentiert die Reduktasen, die Diphosphate (ADP, CDP, GDP und UDP) umsetzen (EC 1.17.4.1.). Charakteristisch für diese Gruppe ist proteingebundenes Eisen, das eine spezifische Hemmung durch Komplexbildner wie Hydroxyharnstoff ermöglicht¹⁵. Meist werden zusätzlich Mg^{++} -Ionen und ATP (als Effektor) benötigt.

Die zweite Gruppe repräsentiert vom *Lactobacillus*-Enzym¹⁶, setzt im allgemeinen Triphosphate um (EC 1.17.4.2.). Es benötigt zur Aktivität unbedingt 5'-Desoxyadenosylcobalamin als Coenzym. Dabei werden über die 5'-Methylengruppe mehrere enzymatische Wasserstoffverschiebungen katalysiert (s. Abb. 1). Diese Reduktionstypen sind in verschiedenen Übersichtsartikeln beschrieben, zuletzt von Follmann¹⁷ und Hogenkamp & Sando¹⁸.

Allen Ribonucleotidreduktasen gemein ist ihre Regulation durch Effektoren. Als solche wirken vor allem Desoxy- und Ribonucleosidtriphosphate. So regulieren *E.coli*-Zellen die Desoxyribonucleotidbiosynthese über einem komplexen Kontrollmechanismus: Die Reduktion von CDP und UDP wird durch ATP, die von ADP und GDP durch dTTP stimuliert, dATP hemmt die Reduktion aller Ribonucleosiddiphosphate. Dies scheint einen homöostatischen Mechanismus für die ausgewogene Versorgung

Abb. 1



Schema der Wasserstoffübertragung bei der Ribonucleotid-Reduktion

der Zelle mit allen vier Desoxyribonucleotiden darzustellen. Wenn die DNA-Synthese abgeschlossen ist, wird durch die Anhäufung bestimmter Nucleotide auch die weitere Ribonucleotidreduktion unterbunden^{19,2}.

Im allgemeinen werden Ribonucleotidreduktasen im Cytoplasma gefunden. Neuere Untersuchungen haben auch in einer post-mikrosomalen Membranfraktion aus Rattenleber und Tumoren Enzymaktivität nachgewiesen²⁰. Der Verdacht auf einen Multi-enzymkomplex mit weiteren Enzymen der DNA-Synthese (Thymidylat-Synthetase, Thymidylat-Kinase und DNA-Polymerase)²¹ ließ sich dagegen bisher nicht bestätigen.

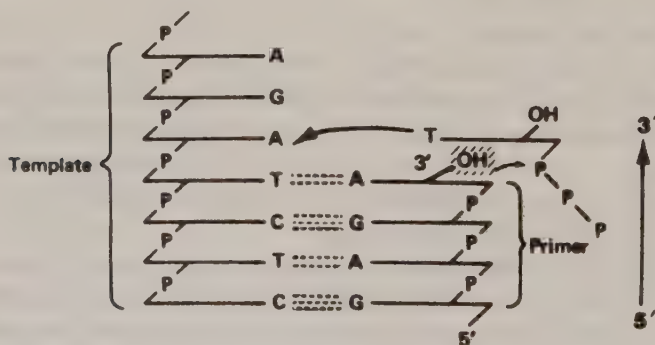
Ribonucleotidreduktasen sind induzierbare Enzyme, die in ruhendem Gewebe kaum nachzuweisen sind. Für ihre Isolierung und Untersuchung sind daher immer rasch wachsende Organismen und Gewebe herangezogen worden. Neben den bereits genannten Bakterien waren es Bakteriophagen, Zellkulturen, embryonale und sich regenerierende tierische Organe und Tumorgewebe.

Die Ribonucleotidreduktion in Pflanzen ist noch sehr wenig untersucht.

1.3. DNA-Polymerasen

Neben Ribonucleotidreduktase, die eine ausgewogene Bereitstellung der DNA-Bausteine sicherstellt, ist DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7.) für die Replication von entscheidender Bedeutung, da sie die Synthese des polymeren DNA-Stranges direkt katalysiert. Mit dem Begriff DNA-Polymerasen verbindet man vor allem das sogenannte "Kornberg-Enzym", das erste in vitro DNA synthetisierende Enzym überhaupt, das aus E.coli isoliert werden konnte^{22,23}. Kornberg und Mitarbeiter haben diese DNA-Polymerase I in den letzten zwanzig Jahren intensiv untersucht. Es ist ein globuläres Protein vom MG 109000, eine einzige Polypeptidkette zeigt gleichzeitig Polymerase- und zwei Nucleaseaktivitäten. Zur enzymatischen DNA-Synthese werden die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate, Mg^{++} -Ionen, eine Matrize (Template) und ein Startpunkt (Primer) benötigt.

Abb. 2



Schema zur Wirkungsweise der DNA-Polymerase I

Erst 1969 stellte sich anhand der Existenz von Polymerase I-defekten E.coli-Mutanten heraus, daß es sich dabei gar nicht um das für die Replication verantwortliche Enzym handelte²⁴. Mittlerweile sind 3 E.coli-Polymerasen bekannt. Polymerase I und II zeigen Reperaturaktivität²⁵, Polymerase III ist am Replicationsprozess beteiligt²⁶. Es gibt erste Anzeichen, daß alle Prokaryonten diese drei Aktivitäten besitzen²⁷.

Auch in Eukaryonten sind verschiedene Polymeraseaktivitäten nachgewiesen worden. Sie werden als α -, β -, γ - (oder A-, B-, C-) und mt-Enzym bezeichnet²⁸.

DNA-Polymerase α gewinnt man aus dem löslichen Überstand einer 100000g-Zentrifugation (S100) eines Zellhomogenats. Sie arbeitet am besten an aktivierter DNA als Template. Da die messbare Aktivität dieses Enzyms mit den in vivo-Einbauraten bei der DNA-Replication übereinstimmt, nimmt man an, daß es sich um das an der DNA-Replication beteiligte Enzym handelt²⁹⁻³⁴. Obwohl diese Polymerase normalerweise im löslichen Überstand gefunden wird, ist bis zu 40% ihrer Gesamtaktivität auch im Kern nachgewiesen worden³⁵. Mit einer besonderen Aufarbeitungsmethode konnte kürzlich sogar 90% der Aktivität in Kernpräparationen bestimmt werden³⁶. Dieser scheinbare Widerspruch, ein für die nucleare DNA-Synthese verantwortliches cytoplasmatisches Enzym, war schon vor einigen Jahren durch Untersuchungen an Seeigelleiern aufgeklärt worden: Man fand dort während der S-Phase des Zellzyklus eine Wanderung der Polymerase-Aktivität in den Kern³⁷.

Unter DNA-Polymerase β versteht man eine nur in den Zellkernen tierischer Gewebe auftretende, DNA-synthetisierende Enzymaktivität. Der Absolutwert ihrer Aktivität bleibt konstant, unabhängig davon, ob es sich um schnell wachsendes oder ruhendes Gewebe handelt. In schnell wachsendem Gewebe stellt sie nur 5-10% der Gesamtaktivität, in ruhendem etwa 50%. Die genaue Funktion des Enzyms ist bisher noch nicht bekannt.

DNA-Polymerase γ trägt mit etwa 1% zur Gesamtaktivität bei³¹. Gerade wegen dieser niedrigen Aktivität und den damit verbundenen Bestimmungsschwierigkeiten ist sie bisher am wenigsten untersucht. Sie wird im Kern und im Cytoplasma gefunden.

Mitochondrielle DNA-Polymerase (Polymerase-mt) unterscheidet sich von den anderen Enzymen in ihrem Templatebedürfnis; außerdem benötigt dieses Enzym kein SH-Reagenz für seine Aktivität und es ist extrem hitzelabil³⁸.

In den sogenannten niederen Eukaryonten (Euglena, Saccharomyces, Tetrahymena) werden meist außer den mitochondriellen und (bei Pflanzen) den chloroplastidären Polymerasen nur noch zwei Enzyme (im Cytoplasma und im Kern) gefunden.

1.4. DNA-Bildung in Pflanzen: Zielsetzung dieser Arbeit

Die Molekularbiologie höherer Pflanzen ist in ihrer Entwicklung - z.T. aus praktischen Gründen - hinter der der Bakterien und tierischen Systeme zurückgeblieben. Hier sind beispielsweise DNA-Polymerasen bisher nur in wenigen Fällen, Ribonucleotidreduktasen erst einmal untersucht worden³⁹. Es ist notwendig, diese Lücken zu füllen, um die an der DNA-Replication beteiligten Enzyme in die Reihe der bisher bekannten Systeme einordnen zu können und Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zu erkennen.

Die spezifische Basenzusammensetzung von Pflanzen-DNA ist häufig analysiert worden, sie zeichnet sich durch einen hohen Anteil von 5-Methyldeoxycytidin neben Desoxycytidin aus. Unter den synthetisierenden Prozessen kennt man die DNA-Synthese beim Weizen und Mais, der Bohne Phaseolus aureus, der Sonnenblume Helianthus tuberosus (Jerusalem Artichoke), dem Lauch Allium cepa, Salat (Lactuca sativa) und Lilium; meist handelt es sich nur um in vivo-Nachweise. Die DNA-Polymerase des Weizens wurde teilgereinigt.

Außer einem indirekten Befund⁴⁰ und einer vorläufigen Mitteilung über Ribonucleotidreduktion in Pflanzen⁴¹ ist Ribonucleotidreduktase bisher ebenfalls nur im Weizen nachgewiesen worden; hinzu kommen Experimente mit synchronisierten Grünalgen⁴².

Meine Arbeit beschreibt Untersuchungen über die Ribonucleotidreduktion und die DNA-Polymerasen zweier dikotyler Pflanzen, der Acker- oder Pferdebohne (Vicia faba) und der Sojabohne (Glycine max). Sie wurden ausgewählt, weil bei ihnen gute Kenntnisse über das Zellwachstum und einzelne Befunde zur Nucleinsäuresynthese vorliegen, die möglicherweise eine Korrelation mit enzymologischen Daten erwarten lassen.

2. Experimenteller Teil

Für die Überlassung von Zellkulturen und Vergleichsnucleotiden danke ich den folgenden Damen und Herren

Prof. Follmann, Prof. Werner, Dr. C. Postius, Marburg;
Dr. Vorbrüggen, Berlin;
Prof. F. Rottman, East Lansing, USA;
K. Kopka, Münster;

ferner Prof. H. Witzel, Münster, und Dr. M. Sprinzl, Göttingen, für den Zugang zum Nucleosidanalysator.

2.1. Pflanzenmaterial

Als Versuchsmaterial wurden Wurzelspitzen der Ackerbohne (*Vicia faba*) und der Sojabohne (*Glycine max*) sowie Zellkulturen beider Pflanzen verwendet. Zur Anzucht der Bohnen werden diese 14 Stunden in dest. Wasser gelegt. Nach Entfernung der Samenschalen folgt eine Oberflächensterilisation in Hypochloritlösung (0,2% aktives Chlor, 5 min). Zur Keimung werden die Samen in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier ausgebreitet und bei 26°C im Brutschrank inkubiert. Das Untersuchungsmaterial, Embryonen oder 2mm lange Wurzelspitzen, kann nach einer Keimzeit von durchschnittlich 16 Stunden mit einem Skalpell präpariert werden. Die Zellkulturen wachsen in einem dunklen, auf 26°C thermostatisierten keimarmen Sterilraum.

Sojabohnen-Suspensionskulturen wurden freundlicherweise von Frau Dr. C. Postius und Herrn Prof. Werner, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Eine Suspensions-Zellkultur der Ackerbohne wurde aus

Wurzelspitzengewebe herangezogen. Nach Anzucht von Kallus-Kulturen aus sterilen Wurzelspitzen auf Agar wurden diese in flüssiges Nährmedium übertragen.

Das von Gamborg⁴³ entwickelte Nährmedium wurde für alle Zellkulturen übernommen.

2.2. Allgemeine Methoden

Isolierung der Rohextrakte

a) Rohextrakt aus Wurzelspitzen von *Vicia faba*

2 mm lange Wurzelspitzen werden mit etwas Aufschlußmedium in einem Teflongefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Zwei ebenso gekühlte Stahlkugeln werden dazugegeben, und das Material im geschlossenen Gefäß in einem "Mikrodismembrator" (Braun, Melsungen) durch hochtourige Vibration zerkleinert. Das zerschlagene Zellgut wird anschließend 1 min in einem Potter-Elvehjem Glas-Homogenisator weiter zerkleinert. Nach dieser Behandlung sind unter Mikroskop keine intakten Zellen oder Zellstrukturen mehr zu erkennen. Das Homogenat wird für 20 min bei 30000g zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 16000 rpm, 4°C). Der klare Überstand stellt den Rohextrakt dar (S30).

Als Aufschlußmedium werden folgende Pufferlösungen verwendet:

50 mM K_2HPO_4 oder Tris/HCl, pH 7,4
0,4% (w/v) = 5 mM Mercaptoäthanol

b) Rohextrakt aus Zellkulturen

Die Zellsuspension wird im Kühlraum auf einer G_3 -Fritte abgesaugt und dreimal mit kaltem Aufschlußmedium gewaschen. Die feste Zellsubstanz wird dann mit etwa dem gleichen Volumen HCl-gewaschenem Seesand in einem Porzellanmörser zerrieben. Während der Zerkleinerung darf man nur soviel Aufschlußmedium zugeben, daß gerade abtropfender Zellbrei

entsteht. Bei dieser Durchführung ist der Aufschluß nach 10 min vollständig. Der Sand und die Zelltrümmer werden durch 10 min Zentrifugation bei 6000g (Sorvall-Zentrifuge, GS3 Rotor, 5000 rpm, 4°C) entfernt. Den Rohextrakt erhält man durch Zentrifugation des 5000g-Überstands bei 30000g (20min).

Aufschlußmedium ist ein TM-Puffer (Tris-Magnesium Puffer)

10 mM Tris/HCl, pH 7,4

20 mM KCl

10 mM $MgCl_2$

0,4 % (w/v) Mercaptoäthanol

Enzymanreicherung durch fraktionierte Ammonsulfatfällung

Vor der Fällung werden die restlichen Zellkompartimente durch Ultrazentrifugation aus dem Rohextrakt entfernt. Nach 1 Stunde Zentrifugation bei 100000g (Beckman-Zentrifuge UZ 65, Ti 50 Rotor, 40000 rpm, 4°C) erhält man einen vollkommen klaren S100-Überstand. Dieser lösliche Überstand wird der Ammonsulfatfällung unterworfen. Der Grad der Sättigung an Ammonsulfat, der erreicht werden soll, wird entweder durch Zutropfen einer gesättigten neutralen Ammonsulfatlösung oder durch Dialyse der Proteinprobe gegen eine $(NH_4)_2SO_4$ -Lsg. der gewünschten Sättigungskonzentration hergestellt. Der Protein-niederschlag wird in Testpuffer aufgenommen und zur Entfernung des Ammonsulfat zweimal 4 Stunden gegen Testpuffer dialysiert.

Testpuffer für Reduktasetests:

50 mM K_2HPO_4 oder Tris/HCl, pH 7,4

5 mM Mercaptoäthanol

Testpuffer für DNA-Polymerase-Tests:

20 mM Tris/HCl, pH 7,4

10 mM KCl

1 mM $MgCl_2$

10 % (w/v) Glycerin

5 mM Mercaptoäthanol

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard⁴⁴. Um die Folin-Methode der Bestimmung phenolischer OH-Gruppen (Tyrosin im Falle der Proteine) auch in stark mercaptoäthanolhaltigen Proteinextrakten durchführen zu können, wird das Protein durch Fällung in effektiv 10% Trichloressigsäure gewonnen und wieder aufgelöst. Die Extinktion wird bei 750 nm gegen einen Reagenzien-Blindwert gemessen.

DNA-Bestimmung⁴⁵

DNA ist in Anlehnung an die Diphenylamin-Methode von Burton⁴⁶ bestimmt worden. In einem Schliffreagenzglas werden 0,5 ml DNA-haltige Lösung, die 10% Perchlorsäure enthält, mit 0,5 ml einer vierprozentigen Diphenylaminlösung in Eisessig und 25 µl einer 0,16 prozentigen wässrigen Acetaldehydlösung zusammengegeben. Die Gläser müssen mit gefetteten Glasstopfen verschlossen werden, damit kein Eisessig verdampft. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C ist die Farbbildung abgeschlossen. Um bei der kolorimetrischen Messung Störungen durch Trübung auszuschließen, werden die DNA-haltigen Proben gegen eine Minus-DNA-Blindprobe bei 595 und 700 nm gemessen und die Differenzen ($E_{595} - E_{700}$) ausgewertet. Eine Eichkurve ist mit Kalbsthymus-DNA aufgenommen worden. Die Konzentration der zur Erstellung der Eichkurve benutzten Thymus-DNA-Lösung ergibt sich aufgrund des durchschnittlichen Molgewichts der kondensierten Nucleotide (= 309)⁴⁷ und des durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten (= 6000)⁴⁸ aus der Formel:

$$E_{260} \times \frac{309}{6000} = \text{mg DNA/ml}$$

Der Fehler, der durch die Benutzung dieser Durchschnittswerte für Thymus-DNA in die Bestimmung von DNA anderen Ursprungs

gerät, ist sehr gering und wurde in Kauf genommen.

Radioaktivitätsmessung

a) Wässrige Lösungen werden mit 10 ml Szintillator ("Aquasol" oder "Unisolve") versetzt und die Radioaktivität nach der Methode des externen Standardkanalverhältnisses in einem Flüssigkeitsszintillationsphotometer (Packard, 3380/540) gemessen. Als Energiefenster dient die vom Werk fest verdrahtete Isotopen-Festeinstellung für Tritium-Einfachmarkierung.

b) Radioaktivitätsmessung auf Filterplättchen kann in demselben Messgerät bei folgender Einstellung erfolgen:

Automatic Standardization:	Ratio - Out
Messkanaleinstellung:	A - B
Verstärker:	25 %
Kanalfenster	20 - 350 Skt.

Der Maschinenblindwert beträgt für beide Messmethoden 15 ± 10 cpm. Die Zählausbeute für tritiierte DNA auf Whatman GF/A-Filtern beträgt 23 Prozent.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Cary-15-Spektralphotometer bei 25°C in 1 cm Quarzküvetten aufgezeichnet. Für Extinktionsmessungen bei einer bestimmten Wellenlänge wurde ein Zeiss PMQ III mit thermostatisierter Küvettenhalterung verwendet.

Nachweis von Ribose (cis-Diol-Struktur) durch Perjodat-Oxidation⁴⁹

5 μl Substanzlösung werden mit 5 μl 0,1 M NaJO_4 und 5 μl 1 M $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}$ -Lösung 90 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktionslösung auf pH 8,5 gebracht und mit Äthylen-glycol versetzt. Überschüssiges Perjodat wird damit zerstört. Ribonucleoside und-nucleotide werden zu den Basen abgebaut,

Desoxyriboverbindungen werden nicht angegriffen.

2.3. Enzymtests

Ribonucleotidreduktase-Standardtest

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität ist mit Hilfe von radioaktiv markiertem Substrat untersucht worden. Der Umsatz von (5-³H)-CDP zu dem entsprechenden Desoxyribodiphosphat dCDP wird nach Abbau zum Monophosphat oder Nucleosid papier- oder säulenchromatographisch bestimmt⁵⁰. Der Standardtest setzt sich folgendermaßen zusammen:

Komponentengemisch (Mix)	Konzentration	Konzentration im Reaktionsgemisch
1 ml ATP	12,1 mg/ml	3,12 mM
0,6 ml Mg(CH ₃ COO) ₂	5,0 mg/ml	3,28 mM
0,5 ml DTT	18,5 mg/ml	9,4 mM
0,1 ml FeCl ₃	0,48mg/ml	0,04 mM
0,1 ml Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,71mg/ml	0,05 mM
0,2 ml (5- ³ H)-CDP	1,0 mCi/ml bzw. 23 Ci/mMol	1,36 μ M, 10 μ Ci 0,43 nMol/Test

Vor dem Zusammenpipettieren des Mix wird die CDP-Lösung in einen Exsikkator gestellt (15 min, Wasserstrahlvakuum), um den zur Stabilisierung der Substanz zugesetzten Äthanol zu entfernen⁵¹. 0,2 ml Proteinlösung (3 - 5 mg) werden mit 0,12 ml Mix 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Vor der sich anschließenden Hydrolyse zu den Monophosphaten mit 1 ml 1 M HClO₄ gibt man 1 μ Mol CMP und dCMP als Träger in die Testlösung. Bei der sauren Hydrolyse, die 10 min bei 100°C durchgeführt wird, fällt gleichzeitig das Protein aus. Es wird mit 4 M KOH neutralisiert und nach einer halben Stunde im Eisbad der Niederschlag abzentrifugiert. Aus der auf 100 μ l eingeeengten überstehenden Lösung wird die Produktbildung papier- oder säulenchromatographisch bestimmt.

Alternativ wird aus der Reaktionslösung das Protein durch Erhitzen auf 100°C (3 min) ausgefällt. Durch Inkubation mit $50\text{ }\mu\text{g}$ Apyrase (15 min bei 37°C) kann zu den Monophosphaten abgebaut werden. Danach wird $50\text{ }\mu\text{l}$ 1 M Ammoniumacetatpuffer pH 8,8 und $10\text{ }\mu\text{l}$ alk. Phosphatase (BAP, 1 mg/ml) zugegeben und die Tests weitere 3 Stunden auf 37°C gehalten. Dann kann das Reaktionsprodukt des Ribonucleotidreduktasetests als Desoxynucleosid bestimmt werden.

Papierchromatographische Analyse: Absteigend auf Schleicher & Schüll 2043b MgI - Papier mit Reichards Laufmittel (LM I). Die Laufzeit beträgt je nach Temperatur 20 - 30 Stunden.

Säulenchromatographische Analyse: CMP und dCMP werden ionenausschlußchromatographisch an Dowex 50 WX 2 oder 50 WX 8 getrennt

Säulengröße: 25 x 0,9 cm

Elutionsmittel: 0,2 M Essigsäure

Laufzeit: etwa 30 Stunden

oder ionenaustauschchromatographisch: Trennung auf der Nucleosidstufe an Beckman M 71 -Harz^{52,53}:

Säulengröße: 30 x 0,5 cm

Elutionsmittel: 0,4 M NH_4CHOO , pH 4,65

Laufzeit: 2,5 Stunden

Die Bildung des dCMP wurde als prozentualer Anteil an der Summe aus dCMP und CMP angegeben, da sich Störungen, z.B. Abbau von Substrat und Produkt in die Uracilreihe je nach Aufreinigung in sehr unterschiedlichem Ausmaß bemerkbar machten. Substratsättigung ist bei Ribonucleotidreduktasetests in diesem Stadium der Enzymreinigung aus technischen Gründen nicht erreichbar; jedoch sind Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit identisch gewonnener Werte i.a. gewährleistet (vgl. z.B.⁴²)

DNA-Polymerase-Standardtest

Die Bestimmung der DNA-Polymeraseaktivität erfolgt durch Analyse des Einbaus radioaktiv markierten Desoxynucleosid-triphosphats in die säurefällbare Fraktion. Der Standardtest setzt sich folgendermaßen zusammen:

Komponentengemisch (Mix)		Konzentration	Konzentration im Reaktionsgemisch
0,2 ml	DNA,aktiviert	0,7 mg/ml	40,7 μ g/ml
je 0,1 ml	dATP,dGTP,dCTP	1,0 mM	29,1 μ M
0,04 ml	(methyl- 3 H)dTTP	1,0 mCi/ml	0,39 μ M = 2 μ Ci
0,1 ml	MgCl ₂	0,1 M	3,0 mM
			ges. 3,8 mM ←
Protein in Testpuffer			
0,14 ml	Tris/HCl,pH 7,4	0,02 M	16 mM
	KCL	0,01 M	8 mM
	MgCl ₂	1,0 mM	s.o.
	Glycerin	10% (w/v)	8% (w/v)
	Protein	0,36 mg/ml	0,29 mg/ml
	Mercaptoäthanol	5,0 mM	4 mM

Mit dem Zusammenpipettieren von 32 μ l Mix und 140 μ l Proteinlösung wird die Reaktion gestartet. Die Inkubationsdauer bei 30°C beträgt 60 min. Danach werden die Gefäße in Eis gestellt, um die DNA-Bildung zu stoppen. Man pipettiert aliquote Anteile der Reaktionslösung (meist 50 μ l) auf Glasfaserfilter, die in einem Filterhalter jeweils 15 min in folgenden eiskalten Lösungen gewaschen werden.

1. 10% (w/v) Trichloressigsäure
2. 5% " "
3. 5% " "
4. Äther/Äthanol 1:3
5. Äther

Nach dem Trocknen unter einer IR-Lampe werden die Proben mit 10 ml Szintillator (Toluol, 0,5% PPO, 0,01% POPOP) ausgezählt.

Aktivierung der DNA

Für die Tests der DNA-abhängigen DNA-Polymerasen kam aktivierte DNA zum Einsatz. Die Aktivierung wurde durch Desoxyribonuclease-Behandlung erreicht. Dabei entstehen "nicks", die zu Doppelstrangbrüchen mit überlappenden 5'-Enden führen können. Um für die gesamten Tests ein einheitliches DNA-Testmaterial zur Verfügung zu haben, wurden in einem Ansatz 200 mg DNA aktiviert und in 1 ml Portionen eingefroren.

Aktivierungsvorgang:⁵⁴

Thymus-DNA	200 mg	
Rinderserumalbumin	100 mg	
MgCl ₂	1 mMol	in 200 ml
KCl	1 mMol	10 mM Tris/HCl, pH 7,4
Desoxyribonuclease	5 µg	30 min/37°C

↓

Zerstörung der Desoxyribonuclease-Aktivität durch Temperaturerhöhung auf 58°C, Zugabe von 11,6 g NaCl, um die DNA nicht zu denaturieren. Nach 15 min wird auf 0°C abgeschreckt.

↓

Jeweils 12 Stunden Dialyse gegen 1. 0,2M KCl und 2. 0,01M KCl

Phosphatase-Bestimmung

Die Bestimmung der sauren Phosphatase erfolgt nach der Methode von Bessy, Lowry und Brock⁵⁵ mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei pH 5,6 durch Messung der Extinktion des gebildeten p-Nitrophenolatanions bei 405 nm in alkalischer Lösung. Bei Einsatz von 10 µl Enzymlösung und 30 min

Reaktionsdauer beträgt die Phosphataseaktivität:

0,54 x 4E (U/ml Proteinelösung)

1 U ist die Enzymaktivität, die 1 μ Mol Substrat in 1 min umsetzt.

2.4. DNA-Markierung

Zur Untersuchung der DNA-Synthese werden 2 mm lange Wurzelspitzen präpariert, die einer Markierung von 2 Stunden Dauer unterworfen werden. Die Markierung in Hoaglands Nährmedium mit ^3H -markierten Nucleosiden wird so durchgeführt, daß Keim- und Markierungszeit die gewünschte Gesamtwachstumszeit ergeben. Zur Isolierung der DNA werden die Wurzelspitzen folgendermaßen aufgearbeitet:

1. Zerkleinerung der Wurzelspitzen wie unter "Isolierung des Rohextrakts" beschrieben

2. Zur Extraktion der DNA werden die zerkleinerten Wurzelspitzen im 10-fachen Volumen Tris/HCl Puffer, pH 7,4 (50 mM Tris/HCl + 50 mM Na-Citrat, fünfprozentig an SDS) für 16 Stunden bei 60°C gerührt. Zur Entfernung von Ungelöstem wird anschließend 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Christ Zentrifuge).

3. Aus dem Überstand wird die DNA mit 70%igem Äthanol gefällt, den Niederschlag wäscht man noch dreimal mit 70%igem Äthanol.

4. Die DNA-Fasern werden über Nacht in 2 M NaCl-Lösung gelöst.

5. Fällern und Waschen wie unter Punkt 3

6. Man löst die DNA über Nacht in 0,15 M NaCl/0,015 M Na-Citrat ("SSC-Puffer").

7. Die DNA wird durch Inkubation mit Ribonuclease A (1/20 Volumen einer Lösung von 2 mg/ml in 0,15 M NaCl, pH 5,0) von eventuell mitgefällter RNA befreit; Inkubationsdauer 30 min/37°C. Durch Erwärmen auf 80°C kann die Ribonuclease vorher desoxyribonucleasefrei gemacht werden.

8. Die NaCl-Konzentration in der DNA-Lösung wird mit festem

NaCl auf 2,5 M gebracht und Protein durch mehrmaliges Ausschütteln in Chloroform/Isoamylalkohol (24:1,v/v) entfernt.
9. Aus dem wässrigen Überstand fällt man die DNA, man wäscht dreimal mit 70%igem Äthanol und löst in 1 mM NaH_2PO_4 Puffer, pH 7,2.

10. Zur Entfernung niedermolekularer Anteile wird die DNA-Lösung über Hydroxylapatit mit einem Gradienten von 1 mM auf 500 mM Na-Phosphat chromatographiert⁷⁹.

11. Der Peak hochmolekularer DNA bei einer Phosphatkonzentration von 300 - 400 mM findet Verwendung für die Bestimmung der radioaktiven Markierung.

2.5. Chromatographische Verfahren

a) Säulenchromatographie, Ionenausschlußverfahren

Das für die Ribonucleotidreduktasetests verwendete Verfahren zur Trennung von CMP und dCMP eignet sich sehr gut zur Trennung der verschiedensten Cytosinnucleotide. Es beruht auf Ionenausschlußchromatographie an einem Kationenaustauscher bei pH 2,86. Bei diesem pH-Wert liegt z.B. CMP im Gegensatz zu AMP, GMP und UMP als neutrales Molekül vor. Die Ladungstrennung (Base/Phosphatrest) führt aber zu einem geringfügigen Rückhalteeffekt, so daß CMP viel später als das ebenfalls neutrale Uridin eluiert wird. Bei einer Säulenlänge von 25 x 0,9 cm und einer Fließgeschwindigkeit von 8,5 ml/Stunde dauert die Trennung etwa 30 Stunden.

b) Säulenchromatographie, Ionenaustauschverfahren

Ionenaustauschchromatographie an Beckman M 71 Kationenaustauscher bei pH 4,65 in einem Nucleosidanalysator^{52,53} ergibt eine ausgezeichnete Trennung der verschiedenen Nucleoside und Basen. Gleichzeitig wird durch die Registrierung der Extinktion bei 260 und 280 nm mit dem Quotienten E_{280}/E_{260} eine zusätzliche, für Nucleinsäurebausteine charakteristische Größe gewonnen.

c) Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie

Es ist absteigend auf Schleicher & Schüll Papier 2043b Mgl chromatographiert worden. Für die Dünnschichtchromatographie sind mit Cellulose beschichtete Folien verwendet worden.

Fließmittel:

I (nach Reichard):	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 5 M, pH 9,5	20 ml
	$\text{Na}_3\text{B}_4\text{O}_7$, ges.	80 ml
	Äthanol	220 ml
	EDTA 0,5 M	0,5 ml

II Isopropanol/ H_2O / NH_3 , 2 M 7:2:1

III Äthanol/1 M Ammoniumacetat 5:2

IV 1 M LiCl, ges. H_3BO_3 /Äthanol 1:1

V 0,1 M H_3BO_3

Nachweis von Nucleosiden auf Papierchromatogrammen
(cis-Diol-Struktur)

Das Papierchromatogramm wird mit einer 0,3-prozentigen Lösung von Bleitetraacetat in Eisessig und nach 1 Minute Einwirkungszeit mit einer 3-prozentigen Benzidinlösung in Eisessig besprüht. Die Nucleoside erscheinen als helle Flecken auf blauem Grund.

Nachweis von Nucleosidphosphaten (Phosphatnachweis)

Das Papierchromatogramm wird mit einer perchlorsauren Ammoniummolybdatlösung besprüht. Durch Bestrahlen mit UV-Licht erscheinen phosphorhaltige Substanzen als blaue Flecken auf hellem Untergrund. Eventuell ist das Papier nach dem Besprühen 5 min auf 90°C im Trockenschrank zu erwärmen.

Zusammensetzung der Sprühlösung:

5 ml 60% HClO_4 , 10 ml 1 N HCl, 25 ml 4% Ammoniummolybdatlösung, mit H_2O auf 100 ml auffüllen.

2.6. Gewinnung und Eigenschaften von Zellsuspensionskulturen

Pflanzliche Zellkulturen werden in der Regel auf Agar angelegt und anschließend in ein flüssiges Nährmedium übertragen. Nachdem die Oberfläche mit Hypochloritlösung sterilisiert worden ist, wird das Gewebe mit einem sterilen Skalpell präpariert und auf Agar übertragen. Dabei bringt man eine große Anzahl Gewebestückchen jeweils einzeln auf Petrischalen, um die wenigen Kulturen herauszufinden, die auf Dauer wirklich steril bleiben. Sie werden dann der Isolierung zweiter Ordnung unterworfen, d.h. das undifferenzierte Kallusgewebe wird vom Explantat abgetrennt und auf frischen Agar übertragen. Die weiteren Umsetzungen sind relativ einfach. Sie beschränken sich auf die Erhaltung der Proliferation der undifferenzierten Gewebemassen^{56,57}.

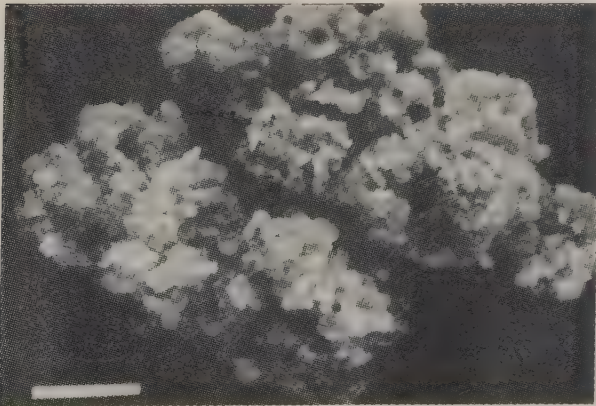
Aus *Vicia faba*-Wurzelspitzen herangezogene Kalluskulturen wurden ein halbes Jahr auf Agar gehalten bis Gewebebrocken von cm^3 -Größe vorhanden waren. Mit diesen großen Kalli gelang die Umwandlung in eine Suspensionskultur; sie wurden direkt in B_5 -Medium übertragen und auf einem Schüttler in einem dunklen, 26°C -warmen Raum gehalten. Durch die heftige Schüttelbewegung entstanden kleinere Zellverbände, die bevorzugt bei den Umsetzungen auf frisches Nährmedium verwendet wurden, so daß nach drei bis vier Durchgängen eine relativ homogene Zellkultur aus etwa 1 bis 2 mm großen Zellaggregaten entstanden war.

Wachstumsbestimmung der Zellkulturen über das "packed cell volume" (pcv)

Die pcv-Bestimmung wird täglich mit 1 ml Zellsuspension durchgeführt. Die dafür in der Mikrobiologie üblichen Glasgefäße sind für pflanzliche Zellkulturen nicht brauchbar. Das Zellmaterial wird deshalb in 400 μl Beckman-Gefäße

mit aufgesteckten kleinen Glastrichtern gefüllt, die mit Eichmarkierungen von 20 μ l Abstand versehen worden sind. Durch vorsichtiges Anzentrifugieren in einer Tischzentrifuge erreicht man, daß sich die Zellpartikel im Gefäß sammeln. Man kann die Trichter (mit einem Teil der überstehenden Lösung) abziehen und die Proben in speziellen Kunststoffeinsätzen zentrifugieren. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wird die Zentrifugation in der Christ Zentrifuge genau 5 min bei 4000 rpm durchgeführt.

Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentration in Zellkulturen
Das Zellmaterial wird mit siedendem 85%igem Methanol behandelt, dreimal mit eiskalter 10%iger Trichloressigsäure extrahiert und mit 80%igem Äthanol, ges. an Natriumacetat, und 95%igem Äthanol neutralisiert. Zur Entfernung der Lipide wird mit Chloroform/Äthanol (1:3), Äther/Äthanol (1:1) und Äther gewaschen. Der trockene Rückstand wird über Nacht in 0,3 N KOH gelöst. Aus einem Aliquot des alkalilöslichen Anteils kann dann die Proteinkonzentration nach Lowry et al. bestimmt werden. Der Hauptanteil wird zur Fällung der DNA mit kalter Perchlorsäure angesäuert. Aus dem Niederschlag wird die DNA-Konzentration nach Burton bestimmt.



Kalluskultur aus *Vicia faba*-Wurzelspitzen-gewebe

— Markierung = 1 cm

2.7.Reagentien und andere Materialien

Nucleoside und Nucleotide

Die in den Enzymtests verwendeten Substanzen CMP,dCMP,ATP sowie die Desoxyribonucleosidtriphosphate und Vergleichs-substanzen stammten von Boehringer,Mannheim,Merck oder Pharma-Waldhof. DTT wurde bei Sigma oder Merck gekauft. Die Substanzen wurden chromatographisch und UV-spektroskopisch auf Reinheit getestet.

2-Thiocytidin	Dr. Vorbrüggen,Berlin
2-Thiouridin	Dipl.Chem. K.Kopka,Münster
2' (3')-O-Methylcytidin	Prof. H.Follmann
2'-O-Methyl-CMP	Prof. F.Rottman,East Lansing
³ H-markierte Nucleoside,Nucleosiddiphosphate und Desoxy- ribonucleosidtriphosphate: The Radiochemical Centre,Amersham	
Kalbsthymus-DNA,hochmolekular: Boehringer,Mannheim	
Poly-(dT,dA)	" "
Weizen-DNA	Dipl.Chem. H.Müller
Coenzym B ₁₂	Dr. H. Hogenkamp,Iowa City

Enzyme

Ribonuclease A	Boehringer,Mannheim
bakt. alk. Phosphatase	" "
Desoxyribonuclease I	" "
DNA-Polymerase I aus E.coli	" "
Apyrase aus Kartoffeln	Sigma,St. Louis
5'-Nucleotidase (aus Schlangengift)	" "
Luciferin Luciferase	" "

Chemikalien und Materialien

2,5-Diphenyloxazol (PPO)	E.Merck,Darmstadt
1,4-Di(2(5-phenyloxazolyl)benzol) (POPOP)	" "
Unisolve (Szintillations-Cocktail)	Zinsser,Frankfurt
DEAE-Cellulose (DE 32)	Whatman
GF/A-Filter	"

Dowex-Ionenaustauscher	Serva, Heidelberg
Dialyseschlauch "Visking"	" "
Hydroxylapatit	" "
Chromatographiepapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Dünnschichtcellulose	E. Merck, Darmstadt
(Folie und Platten)	

3. Ribonucleotidreduktion und DNA-Synthese in Vicia faba und Glycine max

3.1. Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Vicia faba und Glycine max

Für die Untersuchung induzierter Enzyme ist die Wahl geeigneter Untersuchungsobjekte von ausschlaggebender Bedeutung. Die Ackerbohne, Vicia faba, gehört neben Pisum sativum, Glycine max, Arachis hypogaea und Phaseolus vulgaris zu den Leguminosen, die am häufigsten für molekularbiologische Untersuchungen über die Proteinbiosynthese oder dem Ablauf der DNA-Replikation und Zellteilung benutzt wurden⁵⁸. Ihre Samen lassen sich auf einfache Weise ankeimen und daraus die Embryonen isolieren. Nach der Wasseraufnahme läuft der erste Zellzyklus teilsynchron ab; danach sinkt der Mitoseindex auf den durch das Zeitverhältnis von Kernteilung und Gesamtzyklus bestimmbaren Wert ab. Um diese Teilsynchronität ausnutzen zu können, sind die Untersuchungen an Vicia faba nur mit frisch angekeimten Samen durchgeführt worden, die sich noch im ersten Zellzyklus befinden. Zonen intensiver Zellteilung sind die meristematischen Abschnitte der Sprosse und Wurzeln, in keimenden Samen sind es die Wurzelspitzen. Deshalb wurden nach ersten Untersuchungen mit ganzen Embryonen aus Vicia faba nur noch die Wurzelspitzen als Untersuchungsmaterial herangezogen. Da sich unter diesen Umständen aber keine größeren Mengen gleichartigen Ausgangsmaterials isolieren lassen, wurden die Untersuchungen im weiteren Verlauf der Arbeit auch auf Zellkulturen aus Wurzelspitzen der Ackerbohne und Sojabohne ausgedehnt.

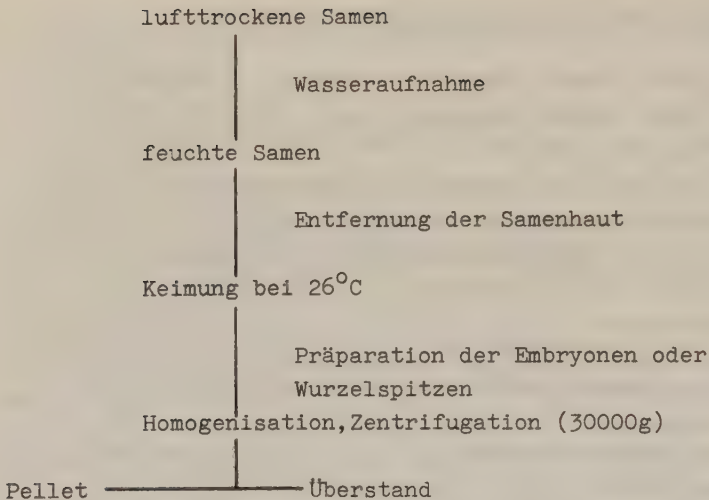
3.1.1. Nachweis der Enzymaktivität in *Vicia faba*

Während der Dauer dieser Arbeit sind jeweils ab Beginn des Winters die Samen des ablaufenden Jahres 1973, 1974, 1975 benutzt worden. Eine jahreszeitliche Periodizität der Mitosehäufigkeit oder gar eine Tagesperiodizität kann bei Einhaltung von Standardbedingungen vollkommen ausgeschlossen werden⁵⁹; eine Altersabhängigkeit der Ribonucleotidreduktase-Reaktion, wie beim Weizen gefunden⁶⁰, wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Zum Ankeimen der Bohnensamen konnten die Methoden von Jacob und Bovey⁶¹ weitgehend übernommen werden; diese Autoren untersuchten mit in vivo-Markierungsexperimenten die frühe RNA-, DNA- und Proteinsynthese in *Vicia faba* Wurzelspitzen. Allerdings wurde die Zeit der Wasseraufnahme (Imbibition), die in erster Linie von der Wassertemperatur und der Größe der Bohnen abhängt, erneut bestimmt. Danach ist bei Zimmertemperatur (20°C) nach 14 Stunden über 90% des benötigten Wassers aufgenommen. Dieser Zeitpunkt wird als Nullpunkt für die Zeitrechnung beim Keimungsvorgang definiert.

Im Gegensatz zur Aufarbeitungstechnik bei Jacob und Bovey wurden nicht 1 mm lange Wurzelspitzen sondern 2-3 mm Spitzen präpariert, um eine ausreichende Menge an Ausgangsmaterial zu erhalten. Cytologische Untersuchungen des mitotischen Index im Wurzelspitzengewebe⁶² belegen, daß der Bereich bis 2 mm oberhalb der Wurzelkappe als meristematisches Gewebe angesehen werden kann.

Nach der Wasseraufnahme wurden die Bohnensamen für verschiedene Zeiten bei 26°C inkubiert. Das Schema der Enzymisolierung zeigt den gesamten Ablauf der Aufarbeitung. Die Proteinkonzentration des zentrifugierten Extraktes betrug im Mittel 20 - 25 mg/ml, so daß für einen Enzymtest 4 - 5 mg Protein eingesetzt wurden.



Schema der Enzymisolierung aus *Vicia faba*

Vor Beginn dieser Arbeit gab es einen Anhaltspunkt, daß für die Ribonucleotidreduktion in *Vicia faba* ein den übrigen bisher untersuchten Eukaryonten entsprechendes Enzym verantwortlich ist: Bei Untersuchung der dCMP- und DNA-Synthese in vivo fand man eine deutliche Hemmung mit Hydroxyharnstoff oder Desoxyadenosin^{63,40}. Meine Tests sind deshalb von Anfang an in einem ATP- und $\text{Fe}^{++}/\text{Fe}^{+++}$ -haltigen Puffer durchgeführt worden. Sie wurden papierchromatographisch mit einem borathaltigen Laufmittel nach Reichard (LM I) ausgewertet. In zahlreichen Versuchsserien traten nach 16 Stunden Keimzeit geringe Mengen von enzymatisch aus CDP gebildetem Cytosindesoxyribonucleotid (bestimmt als dCMP) auf. Sie waren jedoch schlecht reproduzierbar und quantitativ mit der papierchromatographischen Auswertung nicht zu bestimmen (Abb.3, Abb.5, I).

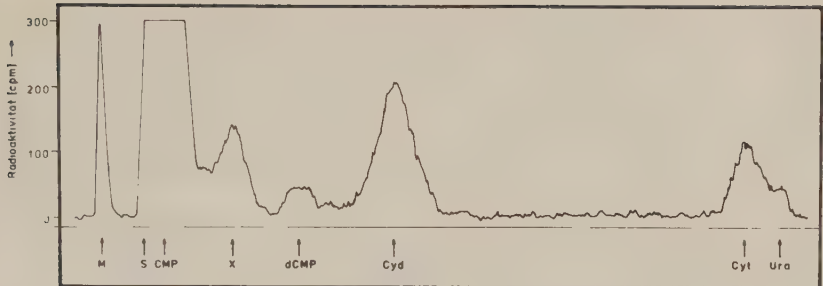


Abb. 3

Radioaktivitätsverteilung nach der papierchromatographischen Auftrennung der Reaktionsprodukte des Ribonucleotidreduktase-tests, M = Marker, S = Start

Um diese Ergebnisse reproduzierbarer zu gestalten, wurde die Temperatur bei der Wasseraufnahme auf 4°C (Kühlschrank) gesenkt; damit sind mögliche Temperaturschwankungen während der Wasseraufnahme ausgeschaltet. Der vorzeitige Wachstumsbeginn eines Teils der Samen ist unter diesen Bedingungen ausgeschlossen. Nach mehreren Testserien, die Wässerungszeit mußte auf 16 Stunden ausgedehnt werden, ergab sich jedoch keine Verbesserung der Ergebnisse. Es ließ sich nur vereinzelt Ribonucleotidreduktase-Aktivität nachweisen. In diesen Fällen verschob sich der Zeitpunkt der Enzymaktivität mit der Erniedrigung der Anfangstemperatur auf 24 Stunden nach Beginn der Keimung (Abb. 5, II). Für die weiteren Untersuchungen wurden daher wieder die ursprünglichen Bedingungen gewählt (Wasseraufnahme 14 Stunden bei Zimmertemperatur).

Folgende andere Möglichkeiten zur Optimierung des gesamten Testablaufs wurden daraufhin erprobt:

1. Auswahl der eingesetzten Samen: Es wurde ein Histogramm der Gewichtsverteilung des Bohnenmaterials aufgenommen. Zur weiteren Verwendung kamen nur noch Bohnen eines Gewichts zwischen 260 und 340 mg.

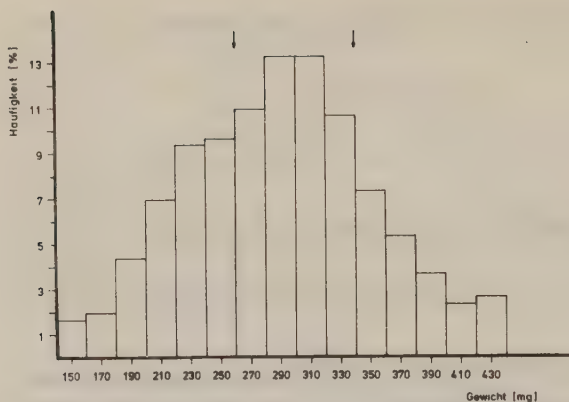


Abb. 4

Histogramm der Gewichtsverteilung einzelner Vicia faba-Samen

2. Durchführung der Zellhomogenisation: Das Gewebe wurde nicht mehr in einem Porzellanmörser zerkleinert, sondern tiefgefroren in einem Mikrodismembrator; außerdem wurde das Homogenat mit einem Potter-Elvehjem-Gerät nachbehandelt.

3. Die Aktivität des angebotenen Substrats wurde von 12,5 $\mu\text{Ci/ml}$ auf 31,2 $\mu\text{Ci/ml}$ erhöht.

4. Bestimmung des Reduktionsprodukts: Das qualitative, papierchromatographische Verfahren wurde durch eine quantitativ auswertbare, säulenchromatographische Methode ersetzt. Sie basiert auf Ionenausschlußchromatographie der Monophosphate CMP und dCMP an Dowex 50 H^+ und ist ebenfalls bei Reichard⁵⁰ beschrieben.

5. Art des Untersuchungsmaterials: An Stelle ganzer Embryonen wurden 2 mm lange Wurzelspitzen präpariert, die nur meristematisches Gewebe enthalten.

Nach diesen Veränderungen wurden die weiteren Ribonucleotid-reduktasetests auf den Bereich von 10 bis 24 Stunden Keimzeit konzentriert, um die ersten Hinweise auf eine Aktivierung

des Enzyms nach 16 Stunden Wachstum genauer präzisieren zu können. Es zeigte sich eine noch immer sehr schwache, aber sinnvoll abgestufte Reduktaseaktivität im Bereich von 16 Stunden Keimzeit (Abb. 5, III). Die quantitativen Werte sind mit anderen Ergebnissen in einer Tabelle auf Seite 38 zusammengefaßt.

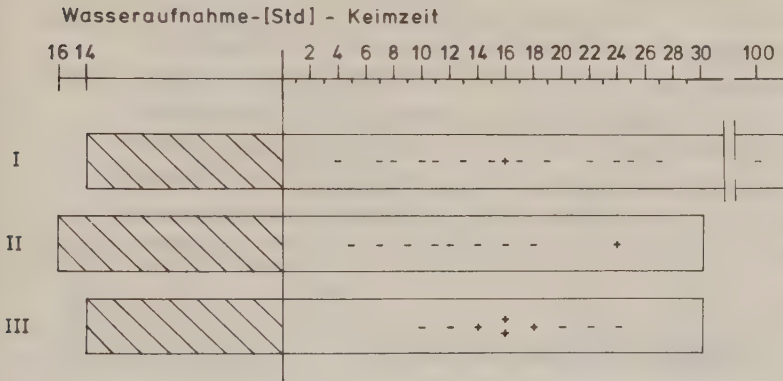


Abb. 5

Ribonucleotidreduktasetests mit S30-Überständen

- dCMP-Bildung nicht nachweisbar
- + dCMP-Bildung erkennbar

Bei allen bekannten Ribonucleotidreduktasen fungieren verschiedene Nucleotide als allosterische Effektoren. Um eine eventuelle Maskierung des Enzyms durch endogene Nucleotide oder niedermolekulare Inhibitoren zu vermeiden, wurden Rohextrakte dialysiert und erneut getestet. Dadurch ergab sich tatsächlich eine Verdopplung des Umsatzes (Tab.1, S.38). Alle Versuche, Ribonucleotidreduktase-Aktivität im Pellet zu finden, blieben erfolglos. Für die weiteren Versuche wurde

deshalb davon ausgegangen, daß es sich bei dem cytoplasmatischen Enzym um die einzige in *Vicia faba* nachweisbare Reduktaseaktivität handelt.

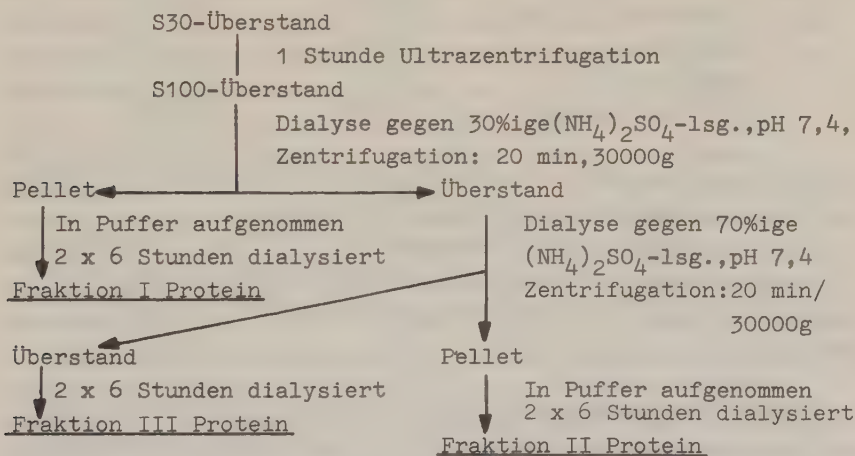
Der Zeitpunkt der auftretenden Enzymaktivität paßt sich in die bisher bekannten Daten vom Ablauf des Zellzyklus in *Vicia faba* gut ein. Evans und Rees⁶⁴ bestimmten die Dauer eines Zellzyklus zu 19,3 Stunden, die der G_1 -Phase zu 4,9 und die der S-Phase zu 7,3 Stunden. Nach den Untersuchungen von Jacob und Bovey⁶¹ sowie von Davidson⁶⁵ liegen die Zellen im trockenen Samen zu 96% bzw. zu 90% in der G_1 -Phase vor. Berücksichtigt man eine Verlängerung der ersten S-Phase durch die notwendige Aktivierung des gesamten Synthesapparats, liegen die erhaltenen Werte in einem vernünftigen Zeitabschnitt. Diese Korrelation und die später beschriebene DNA-Markierung in vivo machen eine bakterielle Kontamination als Ursache der gefundenen Enzymaktivität sehr unwahrscheinlich.

3.1.2. Versuche zur Enzymanreicherung

Der nach dem ersten Nachweis eines Enzyms naheliegende Versuch, durch Anreicherung höheren Substratumsatz zu erreichen, stieß im hier vorliegenden System auf große Schwierigkeiten. Zwei Faktoren begrenzen die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Anreicherungsverfahren: Die Enzymaktivität tritt nur für einen kurzen Zeitraum auf, dadurch sind der Präparation der Wurzelspitzen und der Ausgangsenzymmenge Grenzen gesetzt. Zudem ist die Aktivität äußerst gering und das Enzym wahrscheinlich sehr labil. Deshalb kommen nur Methoden in Betracht, die schnell durchführbar sind und die Enzymkonzentration nicht wesentlich erniedrigen. Dazu zählen die Ammonsulfatfällung und die Affinitätschromatographie.

Es gibt verschiedene Methoden, den gewünschten Sättigungsgrad an Ammonsulfat in einer Proteinlösung einzustellen, z.B. Zugabe des festen Salzes, Zutropfen einer gesättigten Lösung, Dialyse der Enzymlösung gegen eine Ammonsulfatlösung des gewünschten Sättigungsgrads oder säulenchromatographische Auftrennung des ausgefällten Proteins mit einem Ammonsulfatgradienten⁶⁶.

Mit der besonders schonenden Dialysemethode wurden 3 Fraktionen aus S100-Überständen gebildet. Die Rohextrakte stammten von 13 - 17 Stunden alten Bohnenkeimlingen.



Arbeitsschema bei der Ammonsulfatfraktionierung

In den Fraktionen I und III ließ sich keine Ribonucleotid-reduktase-Aktivität nachweisen. In der mittleren Fraktion (II), 30 - 70% Ammonsulfatsättigung ergab sich eine um etwa das 4-fach verstärkte Enzymaktivität, die maximal 0,2% Umsatz pro mg Protein zeigte.

Tab.1

Keimzeit (Stunden)	Enzymfraktion	mg Protein Test	Radioaktivität des dCMP-Peaks (dpm)	Produktbildung ⁺ in %
14	S30-Überstand	5,0	2600	0,05
15-16	S30-Überstand	5,0	4950	0,1
	S30,dialys.	5,0	13000	0,26
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fraktion II	3,5	18450	0,36
17-18	S30-Überstand	5,0	3950	0,08
	S30,dialys.	5,0	9050	0,18
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fraktion II	1,7	17650	0,35
20	S30-Überstand	5,0	1600	0,03

Enzymatische Reduktion von (5-³H)-CDP durch Proteinfractionen aus Wurzelspitzen der Ackerbohne (*Vicia faba*)

⁺ Auf nicht umgesetztes CDP bezogen (5×10^6 dpm)! Die Werte wurden durch parallel bestimmte Blindproben korrigiert, wenn das Substrat nicht vor dem Test von dCDP-Spuren befreit worden war^{6,7}.

Eine affinitätschromatographische Enzymanreicherung ist für empfindliche Proteine besonders vorteilhaft. Die Affinitätschromatographie hat auch bei der Anreicherung von Ribonucleotidreduktasen bereits mehrfach Anwendung gefunden⁶⁸⁻⁷⁰. W.Heyne hat eine für *E.coli*-Ribonucleotidreduktase erfolgreich eingesetzte Aminophenyl-ATP-Sepharose als Säulenmaterial synthetisiert und an ihr Anreicherungsversuche mit *Vicia faba*-Rohextrakten durchgeführt⁷¹. Im Eluat der Affinitätssäule konnte jedoch keine Ribonucleotidreduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Auch Variationen dieser Versuchsbedingungen blieben ohne Erfolg.

Angesichts der ungünstigen Ausgangsbedingungen mußte auf weitere Versuche zur Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus *Vicia faba* verzichtet werden.

Alle Ribonucleotidreduktasen werden durch niedermolekulare Substanzen (Metallionen, Nucleotide) in der Aktivität beeinflußt. Ihre genaue Kenntnis führt zum Verständnis des Enzymmechanismus und ist deshalb von großer Bedeutung. Beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen in *Vicia faba* geht eine genaue Bestimmung der Wirkung von Effektoren über die analytischen Möglichkeiten hinaus und ist ohnehin für das ungeereinigte Enzym nur begrenzt aussagekräftig. Über die für die Klassifizierung des Enzyms wichtige Abhängigkeit von Fe- oder Mg-Ionen, ATP, Dithiolen oder Coenzym B₁₂ können folgende qualitativen Aussagen gemacht werden: Fehlen eines Dithiols wie Dithiothreitol bringt die Aktivität zum Verschwinden. In Tests ohne ATP ist die Reduktion um ca. 30% deutlich erniedrigt, während Mg- oder Eisen-Ionen-Mangel keinen signifikanten Effekt hat. Fehlt jedoch Fe⁺⁺/Fe⁺⁺⁺ und wird zugleich Hydroxyharnstoff (10 mM) zugesetzt, so ergibt sich eine deutliche Erniedrigung der Enzymaktivität. Zusatz von Coenzym B₁₂ (25 µM) und Inkubation im Dunkeln bringt keine Stimulation des Umsatzes; dieser Befund wurde erwartet, da ein B₁₂-Bedürfnis höherer Pflanzen nicht bekannt ist. Die *Vicia faba* Ribonucleotidreduktase ist demnach den Fe-haltigen Enzymen vom *E. coli*-Typ vergleichbar. Auch Extrakte aus der Alge *Scenedesmus* zeigen eine ähnliche Abhängigkeit von ATP und Fe bzw. dem Fe-Komplexbildner Hydroxyharnstoff⁴².

3.1.3. Ribonucleotidreduktase in *Glycine max*

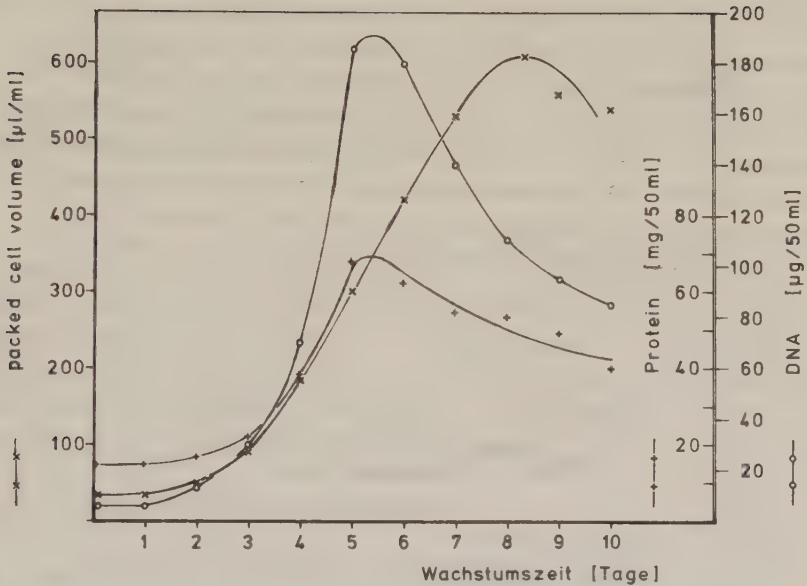
Eine weitergehende Anreicherung der Enzymaktivität bis hin zur Isolierung und Charakterisierung der pflanzlichen Ribonucleotidreduktase scheitert in erster Linie an der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit bot sich die Verwendung der unten beschriebenen Zellkulturen an.

Die zuerst hergestellten *Vicia faba*-Suspensionskulturen schieden jedoch wegen ihres sehr langsamen Wachstums aus.

Sojabohnen- (*Glycine max*)Suspensionskulturen sind dagegen für ihr extrem schnelles Wachstum bekannt; ihre Zellmasse (pcv) nimmt in 10 Tagen auf das zwanzigfache zu. Die Zellen sind undifferenziert und stellen damit ein gleichbleibendes Ausgangsmaterial dar, das leicht in großen Mengen bereitgehalten werden kann.

Eine Wachstumsbestimmung über das packed cell volume ist aber problematisch, wenn der Verlauf der Teilungsaktivität von Interesse ist. Sie ergibt eine Gesamtgröße, die sich zunächst aus der Zunahme der Zellzahl und im Verlauf des Wachstums mehr aus der Einlagerung von Reservestoffen und nicht zuletzt von Wasser bei der Vakuolenbildung zusammensetzt. Ihr sigmoider Verlauf täuscht außerdem ein vor allem im späten linearen Bereich nicht mehr vorhandenes Wachstum vor. Alternativen sind die Bestimmung des Trockengewichts oder die von Hahlbrock vorgeschlagene Leitfähigkeitsmessung der Nitrationen des Mediums^{72,73}, die allerdings auch nur die Wasseraufnahme als Fehlerquelle ausschließt. Für die Untersuchung der Zellteilungsaktivität ist deshalb eine aufwendigere Messung der DNA- und Proteinsynthese unumgänglich. Dazu wurde von der Umsetzung der Kulturen an über den gesamten Wachstumsbereich täglich eine 50 ml Probe abgenommen und das Zellprotein sowie die DNA bestimmt.

Abb. 6



Wachstumscharakteristik einer *Glycine max* Suspensionskultur in B₅-Medium

Der Verlauf der Wachstumskurve zeigt die fünf typischen, vom bakteriellen Wachstum bekannten Bereiche Lag-, Exponentielle-, Lineare-, Übergangs- und Absterbephase. Aus der Übergangsphase, der linearen Phase und logarithmischen Phase der pcv-Kurve wurden Rohextrakte (S30) isoliert und mit dem Standardtest und papierchromatographischer Analyse auf Reduktaseaktivität untersucht. Nur in der Aufarbeitung aus der logarithmischen Phase konnte geringe Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Der positive Befund mit Zellmaterial aus der logarithmischen Phase wurde näher untersucht. Dazu bot sich wieder eine Ammonsulfatfraktionierung an, mit der Fraktionen von nur 10% Sättigungsunterschied hergestellt wurden. Ausgangsmaterial für diese Testreihe waren 100000g-Pellet und die Proteinfraktionen aus dem S100. Eine Serie der jeweils doppelt durchgeführten Tests wurde papierchromatographisch ausgewertet; die Parallelproben der aktiven Fraktionen ergaben dann mit dem aufwendigeren säulenchromatographischen Bestimmungsverfahren die quantitativen Werte (Abb. 7, Tab. 2).

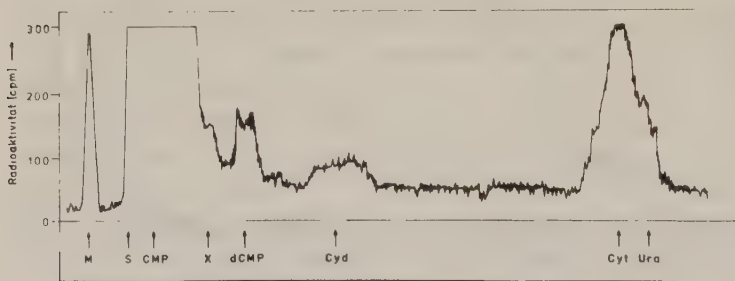


Abb. 7 Papierchromatographischer Nachweis der Ribonucleotid-reduktase-Aktivität in Fraktion III der Glycine max Kulturen

Fraktion	%Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	mg Protein	Produktbildung (%)	
		Test	qualitativ	quantitativ ⁺
I	S100-Pellet	ca. 0,5	-	-
II	0 - 40	0,68	+	0,37
III	40- 50	0,40	+	0,52
IV	50- 60	0,62	+	0,34
V	60- 70	0,70	-	-
VI	70- 90	0,56	-	-

Tab. 2 Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Glycine max-Zellkulturen ⁺ Umsatz/mg Protein, auf nicht umgesetztes CMP bezogen.

Glycine max-Suspensionskulturen zeigen also in der logarithmischen Phase Ribonucleotidreduktase-Aktivität, die nach ihrem Umsatz mit der in Wurzelspitzen aus *Vicia faba* nachgewiesenen vergleichbar ist. Höhere Enzymaktivitäten lassen sich in Pflanzenzellen, wie Untersuchungen an Scenedesmus obliquus und Chlorella pyrenoidosa gezeigt haben⁴², wohl nur über eine möglichst vollständige Synchronisierung des Wachstums erreichen.

In wachsendem Soja-Kallusgewebe hat Cowles (1973) Ribonucleotidreduktase-Aktivität mit (8-³H)-GDP als Substrat beobachtet⁴¹, diese Versuche wurden jedoch nicht näher beschrieben und nicht weitergeführt⁷⁴. Neben der hier nachgewiesenen CDP-Reduktaseaktivität gelang es uns nicht, in den Zellextrakten GDP-Reduktion zu zeigen; allerdings sind die Guanosinnucleotide viel schwieriger zu analysieren als Cytosinnucleotide.

3.1.4. DNA-Markierung durch Cytidin

Die Untersuchungen zur Desoxyribonucleotidbildung in *Vicia faba* haben eine zeitlich begrenzte Enzymaktivität nachgewiesen, die für die Umwandlung von der Ribosereihe zu den Desoxyverbindungen verantwortlich ist. Nun gilt es, diese Syntheseleistung in den Ablauf des gesamten Zellzyklus einzuordnen und die in vitro sehr niedrige Enzymaktivität mit einem anderen, von dem in vitro-Test unabhängigen Verfahren zu bestätigen. Dazu bieten sich in vivo-Untersuchungen der DNA-Synthese an, ein Prozess, der in der Zelle zur Ribonucleotidreduktion parallel laufen sollte. Die DNA-Synthese ist im allgemeinen durch Pulsmarkierung, d.h. zeitlich begrenztes Angebot eines radioaktiven Vorläufers, sehr gut zu verfolgen. Der Einbau von Radioaktivität in säurefällbare Fraktionen ist schnell durchführbar und gut quantitativ meßbar.

Da Nucleosidphosphate die Zellwand nicht passieren, werden als Vorläufer radioaktiv markierte Nucleoside mit dem Nährmedium angeboten. In *Vicia faba* werden solche Untersuchungen bevorzugt mit präparierten Wurzelspitzen durchgeführt. Denn nach Untersuchungen von Macleod⁷⁵ wird der Nucleosidpool in den Primärwurzeln fortlaufend durch Ergänzung aus den Kotyledonen aufgefüllt. Bei der Arbeit mit intakten Samen würde das eine fortlaufende Verringerung der spezifischen Aktivität des angebotenen Nucleosids bedeuten.

In der Regel wird für die DNA-Markierung Thymidin anderen Desoxynucleosiden vorgezogen, weil eine mißbräuchliche Verwendung für die RNA-Synthese auch nach dem Austausch des Zuckerrestes unwahrscheinlich ist. Thymidin liegt allerdings nicht auf dem Hauptweg der Thymidintriphosphat-Bildung, die normalerweise über Methylierung von dUMP besorgt wird. Die Anwesenheit einer Thymidinkinase in *Vicia faba*-Primärwurzeln ist aber von MacLeod⁷⁶ nachgewiesen worden. Trotzdem kann man erwarten, daß nur ein Bruchteil der angebotenen Radioaktivität in die DNA eingebaut wird, weil sie über die Phosphorylierung in den Stoffwechsel eingeschleust werden muß.

Es war nun von Interesse, zur Zeit der ansteigenden Ribonucleotidreduktase-Aktivität die DNA-Synthese zu messen. In einem weiteren Versuch wurde zu verschiedenen Zeiten Ribocytidin mit dem Nährmedium angeboten, um seinen Einbau in die DNA nach in vivo-Reduktion zu verfolgen. Damit läßt sich indirekt der Zeitpunkt der maximalen Ribonucleotidreduktase-Aktivität bestimmen, der dann mit den in vitro gewonnenen Daten verglichen werden kann.

Besonderes Interesse galt schließlich der Hemmbarkeit der DNA-Replication durch Inhibierung der Proteinsynthese mit Cycloheximid. Denn für das zeitlich begrenzte Auftreten von Ribonucleotidreduktase während des Ablaufs eines Teilungszyklus werden niedermolekulare Inhibitoren oder die jeweilige Neusynthese des Enzyms diskutiert. Die DNA-Replication selbst

ist in Gegenwart von Cycloheximid nicht gehemmt^{77,61}. Für die Durchführung dieser Versuche wurden wieder 2 mm Wurzelspitzen präpariert, die die letzten beiden Stunden ihrer Gesamtkeimzeit in Hoaglands Nährmedium mit dem radioaktiv markierten Nucleosid inkubiert wurden. Bei der Aufarbeitung wurde besonders auf eine rigorose und vollständige Abtrennung der Ribonucleinsäuren durch Ribonuclease-Behandlung und durch Hydroxylapatit-Chromatographie geachtet; letztere trennt native DNA vollständig von RNA.

Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse weisen auch eine kurzzeitig zunehmende und wieder abnehmende Ribonucleotid-reduktase-Aktivität nach. Dabei werden im Maximum der Aktivität (16 Stunden Keimzeit) über Cytidin - Desoxycytidin 9% des direkten Einbaus von Thymidin erreicht.

Die Hemmung der Proteinbiosynthese bewirkt eine fast vollständige Blockierung der DNA-Markierung durch Cytidin, deren Ursache nach Untersuchungen von Jacob und Bovey⁶¹ nicht eine direkte Einwirkung auf den Replikationsvorgang sein kann. Die Ergebnisse können nur mit dem Fehlen von Ribonucleotid-reduktase-Neusynthese und fehlendem dCTP-Angebot aus Cytidin erklärt werden. Die Neusynthese der Ribonucleotidreduktase läuft offensichtlich direkt vor der DNA-Replication ab und ist einem schnellen turnover unterworfen. Nur so läßt sich die fast vollständige Hemmbarkeit der DNA-Markierung über Cytidin nach 16 Stunden Keimzeit in dem Fall erklären, daß nur zur Zeit der Inkubation mit (5-³H)Cytidin Cycloheximid zugegeben wird.

Versuch	Keimzeit (Std)	Frisch-Proteinkon- gewichtszentration (g)	Frisch-Proteinkon- zentration (mg/ml)	Aktivität des Nucl.* (μ Ci/ml)	Cycloheximid (μ g/ml)	Aktivität OD DNA (cpm/OD)	Aktivität mg Protein (Akt./mg)	relative Markierung (%)	ATP-Konz. Frischgew. (nMol)
I	16	4,1	-	Thymidin	0	49000	-	-	
				40					
II	10	1,9	2,75	Cytidin	0	1550	570	38	
	16	1,4	5,75	80	0	8700	1500	100	
	24	1,8	6,50	80	0	2800	420	28	
				Cytidin					
III	16	1,15	-	40	0	8100	-	100	36,2
	16	1,15	-	40	100(I)	380	-	5	19,9
	16	1,15	-	40	100(I+K)	130	-	1,5	

Tab. 3

In vivo Markierung von Vicia faba-Wurzelspitzen

- nicht gemessen

I zur Zeit der Incubation

I+K zur Zeit der Inkubation und der Keimung

* (Methyl-³H)Thymidin bzw. (5-³H)Cytidin

DNA-Markierungsuntersuchungen in Pflanzen können leicht durch Bakterienkontamination verfälscht werden⁷⁸. Die artspezifischen Unterschiede in der DNA-Zusammensetzung erlauben jedoch die Identifizierung solcher Artefakte nach MAK-Chromatographie⁷⁹. Sie verraten sich durch eine Trennung der normalerweise übereinanderliegenden UV-Maxima (große Menge pflanzlicher DNA, niedrig markiert) und Radioaktivitätsmaxima (sehr kleine Menge hochmarkierter bakterieller DNA). Derartige chromatographische Tests an Methylalbumin-Kieselguhr-Säulen konnten eine bakterielle Kontamination der *Vicia faba* Wurzelspitzen eindeutig ausschließen. Auch auf Hydroxylapatit-Säulen fallen UV- und Radioaktivitätsmaxima der DNA genau zusammen.

3.2. Ein modifiziertes Nucleotid - Zwischenprodukt oder Nebenprodukt?

Über die Wirkungsweise der bakteriellen Ribonucleotidreduktasen liegen schon zahlreiche Untersuchungen vor. Sie zeigen, daß der Reduktionsprozeß in allen Systemen sehr ähnlich verläuft. Die Wasserstoffübertragung (vergl. S.9) führt von NADPH über das Thioredoxinsystem zum Substrat, das offenbar ohne Durchlaufen von Zwischenstufen am C-2' reduziert wird. Mit radioaktiv markierten Modells substraten konnten Reaktionsmechanismen wie die Eliminierung von Wasser unter Bildung einer 2',3'- oder 1',2'-Doppelbindung als Zwischenprodukt oder eine S_N2 -Substitution der Hydroxylgruppe am C-2' durch ein Hydrid-Ion, die zur Inversion der Konfiguration führen würde, ausgeschlossen werden^{80,81}. Verheyden und Moffat⁸² vermuteten wegen des ATP- und Mg-Bedürfnisses des E.coli-Enzyms eine Aktivierung der Hydroxylgruppe durch 2'-Phosphat oder 2'-Pyrophosphat als Zwischenprodukt. Aber Cytidin-2'-phosphat-5'-diphosphat wurde von E.coli-Reduktase nicht umgesetzt. Obwohl also die Stereochemie der Reduktion gesichert ist, bleibt die Natur der Reduktionsreaktion selbst ungeklärt.

Aus diesem Grund schenken wir einem immer auftretenden Nebenprodukt der Reduktase-Bestimmung in *Vicia faba* besondere Aufmerksamkeit (vgl. Abb.3, S.33). Dabei lag die Ausbeute dieser Substanz "X" bei Enzymtests mit S30-Überständen mit über 2% wesentlich höher als die des dCMP. Nach Ammonsulfatfällung fand sich aber in keiner Fraktion mehr als 0,4% dieser Substanz. Durch Weizenextrakte wurde X ebenso gebildet wie durch Sojabohnen⁷⁴- und *Vicia faba*-Extrakte. Eine übergeordnete Funktion dieser Substanz, eventuell als Zwischenprodukt oder Effektor (Aktivator, Inhibitor) bei der Reduktion, konnte deshalb nicht ausgeschlossen werden. Die Substanz X ließ sich

niemals in wägbarer Menge isolieren, sondern nur durch ihre Radioaktivität und chromatographischen Besonderheiten analysieren. Daher schied eine Strukturaufklärung über Massen- und Kernresonanzspektrometrie ebenso aus wie über IR- und UV-Spektroskopie. Als einzig gangbarer, in der Nucleinsäurechemie aber allgemein gebräuchlicher Weg blieb die Identifizierung durch Vergleich mit Substanzen bekannter Struktur. Es existieren z.B. heute so viele in ihrem wirksamen Prinzip verschiedene Trennverfahren, daß identische Verbindungen mit großer Sicherheit als solche erkannt werden können.

Am naheliegendsten war es, mit den beiden im Reduktasetest angewendeten Verfahren (absteigende Papierchromatographie und Ionenausschlußchromatographie an Dowex 50) erste Anhaltspunkte über die unbekannte Substanz durch Vergleich mit verschiedenen CMP- und UMP-Derivaten zu suchen.

Tab. 4

Nucleotide	Rf-Werte	Nucleoside, Nucleobasen	Rf-Werte
CMP	0,017	Cytidin	0,25
UMP	0,024	Uridin	0,31
X	0,10	Cytosin	0,66
2'-O-Methyl-dCMP	0,10	Uracil	0,71
dCMP	0,14	Desoxycytidin	0,73
dUMP	0,17	Desoxyuridin	0,77
5-Methyl-CMP	0,19		
2'(3')UMP	0,21		
dTMP	0,23		
3',5'-Cyclo-CMP	0,42		

Absteigende Papierchromatographie nach Reichard⁵⁰
(Die Rf-Werte sind sehr temperaturabhängig, die Reihenfolge der Substanzen bleibt aber erhalten.)

Nach den Rf-Werten der Papierchromatographie handelt es sich eindeutig um ein Nucleotid. Mit (5-³H)CDP als Ausgangssubstanz muß es eine Verbindung mit Cytosin oder Uracil als Grundkörper ohne Modifikation am C-5 sein. Aufschlußreicher ist die säulenchromatographische Trennmethode. Durch den pH-Wert des Elutionsmittels (0,2 M Essigsäure) von 2,86 ist sie auf die Trennung von CMP-Derivaten optimiert. Schon kleine Veränderungen der Hydrophilie (z.B. Methylierung, Desaminierung, Reduktion einer Hydroxylgruppe) bewirken eine starke Beeinflussung der Elution, so daß es zu einer breiten Auftrennung solcher Substanzen kommt. Die Gruppe der Cytosinverbindungen wird außerdem insgesamt von den Uracilverbindungen abgetrennt. So läßt sich auch entscheiden, ob eine Desaminierung stattgefunden hat.

Tab. 5

Substanz	Elutionszeit (bis zum Peakmaximum)
UMP	40 Minuten
dUMP	40 Minuten
Uridin	1 Stunde, 20 Minuten
Desoxyuridin/	
Uracil	1 Stunde, 35 Minuten
3',5'-Cyclo-CMP	3 Stunden, 50 Minuten
X	7 Stunden, 5 Minuten
5-Methyl-dCMP	8 Stunden, 10 Minuten
CMP	10 Stunden, 35 Minuten
2'-O-Methyl-CMP	14 Stunden, 30 Minuten
dCMP	16 Stunden, 30 Minuten

Säulenchromatographische Trennung an Dowex 50 (H⁺) nach Reichard (20 x 0,9 cm Säule, Dowex 50 WX 2, 200-400 mesh)

Die Tabelle der Elutionszeiten der Substanzpeaks (Tab. 5) zeigt eindeutig ein CMP-Derivat an. Ob die Modifizierung im Ribose- oder Basenteil vorliegt, läßt sich hiermit noch nicht entscheiden. Wie das Beispiel 5-Methyl-dCMP demonstriert, kann eine Verringerung der Hydrophilie, hier durch Methylierung von dCMP, auch zur Beschleunigung der Elution führen.

Es ist zunächst von Interesse, ob sich die Modifizierung auf den Riboseanteil, den Basenanteil oder auf beide Bestandteile erstreckt. Eine Veränderung der cis-Glykolstruktur der Ribose läßt sich durch die Reaktion mit Perjodat nachweisen; ist die Ribose unversehrt erhalten, kann nach einer Perjodat/Cyclohexylaminbehandlung die Base isoliert werden^{49,83}. Ergänzend schien ein Abbau des Nucleotids X zum Nucleosid durch alkalische Phosphatase sinnvoll, da dann gegebenenfalls Base, Nucleosid und Nucleotid nebeneinander untersucht werden konnten.

Eine sehr gute Identifizierungsmöglichkeit für solche Substanzen bietet der Nucleosidanalysator. Damit lassen sich, ähnlich dem Aminosäureanalysator, Nucleoside und Nucleobasen auf Grund des Elutionsvolumens (und des Extinktionsquotienten E_{280}/E_{260}) identifizieren.

Tab. 6

Substanz	Elutionszeit	Substanz	Elutionszeit
Durchbruch	8-10 min	Cytidin	115 min
(Nucleotide)		2'-O-Methyl-Cytidin	120 min
Uridin	18 min	3'-O-Methyl-Cytidin	132 min
Desoxyuridin	18 min	Desoxycytidin	145 min
Uracil	25 min	5-Methyl-Desoxycytidin	155 min
2-Thiouridin ^{84, §}	20 min	Cytosin	265 min
		2-Thiocytidin ^{84, §}	80 min

Position verschiedener Nucleoside auf dem Nucleosidanalysator
(30 x 0,5 cm Säule, Beckman M 71-Austauscher (NH_4^+))

§ Berechnet nach Messungen an einem anderen Gerät in Münster

Tab. 7

Abbau bis	Reagenz	Elutionszeit	Substanz
X-Base	NaJO ₄ /C ₆ H ₁₃ N	265 min	Cytosin(unvollständig)
X-Nuclepsid	alk.Phosphatase	118 min	Cytidin oder 2'-O-Methyl-Cytidin

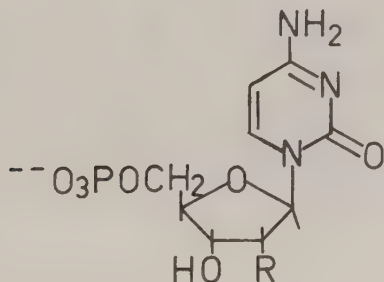
Die Perjodatbehandlung unter Standardbedingungen verlief nur unvollständig, es entstand jedoch Cytosin. Da die Substanz homogen war, muß die unvollständige Reaktion in der Natur des Zuckers begründet sein. Andererseits scheint klar, daß die Base Cytosin unmodifiziert sein muß. Das steht im Einklang damit, daß eine 5-Substitution (Verlust des ³H), N³ und N⁴-Substitution (Ladungsänderung) ebenso wie die in der Natur niemals beobachtete 6-Substitution auszuschließen sind, eine 2-Thio-lierung nicht in Frage kommt (Elutionszeiten, Tab. 6) und eine 5,6-Hydrierung mit Sicherheit die chromatographischen Eigenschaften total verändern würde; zudem wäre eine Dihydropyrimidin-Verbindung nicht säurestabil.

Für das Produkt der Phosphatasespaltung kommen aus unseren Vergleichsproben Cytidin und 2'-O-Methyl-Cytidin in Frage, deren Peaks beinahe übereinander liegen. Cytidin entfällt, da die untersuchte Verbindung mit Sicherheit weder 5'-CMP noch 2'(3')CMP war. Damit handelt es sich bei der Substanz X wahrscheinlich um ein Ribose-modifiziertes-CMP.

Solche Nucleotide werden durch 5'-Nucleotidase aus Schlangengift (EC 3.1.3.5.) nicht dephosphoryliert⁸⁵. Tatsächlich ließ die Behandlung von X ebenso wie im Fall von 2'-O-Methyl-CMP mit 5'-Nucleotidase kein Nucleosid entstehen, sondern X blieb unverändert. Allerdings kann es sich bei der Verbindung X nicht um 2'-O-Methyl-CMP handeln, diese Verbindung müßte völlig perjodat-resistent sein und sich säulenchromatographisch (s. Tab. 5) anders verhalten⁸⁶.

Randerath hat verschiedene dünnschichtchromatographische Verfahren für PEI-Cellulose entwickelt, die unter Ausnutzung der Boratkomplexbildung eine Trennung von Ribonucleotiden und Desoxyribonucleotiden bewirken^{87,88}. Ihr Einsatz schien aufschlußreich, da eine Veränderung der cis-Glykolstruktur auch Auswirkung auf die Komplexbildung mit Borsäure haben muß. Zwei Laufmittel waren für die Chromatographie an PEI-Borat-Cellulosedünnschichtplatten erfolgversprechend: LiCl, ges. H_3BO_3 /Äthanol - 1:1 (LM IV) verhindert durch seine hohe Salzkonzentration eine allzu starke Adsorption der Nucleotide an die Celluloseschicht und bringt dadurch die Wirkung der Boratkomplexbildung auch für die Nucleotide gut zur Geltung. 0,1 M H_3BO_3 (LM V) als Laufmittel führt nur in der Reihe der Nucleoside zur Trennung von Desoxyribo- und Riboverbindungen. Sämtliche Nucleotide verbleiben wegen der geringen Ionenstärke des Laufmittels am Startfleck.

Die Substanz X bleibt nach Chromatographie mit 0,1M H_3BO_3 am Startfleck, dies bekräftigt zusätzlich ihre Nucleotidnatur. Mit Laufmittel IV erscheint X auf der Höhe der Desoxyribonucleotide mit einem R_f -Wert von 0,65; dieser Befund spricht wieder für ein von CMP verschiedenes, zuckermodifiziertes Derivat. Unter Berücksichtigung der geschilderten Untersuchungsergebnisse handelt es sich wahrscheinlich um ein in 2'- oder 3'-Stellung modifiziertes Cytidinnucleotid; 3'-modifizierte Nucleotide sind in der Natur allerdings bisher nicht bekannt.



Die Modifizierung R ist wegen der Aufarbeitungsbedingungen nach dem Reduktasetest säurestabil (HClO_4 -Hydrolyse), kann also kein Acetal sein. In schwach alkalischer Lösung (Perjodatbehandlung, Phosphatasebehandlung) wird sie langsam abgespalten. Zudem zeigte eine längere Zeit gelagerte zuvor homogene Probe von X wieder etwas radioaktives CMP. R muß außerdem eine neutrale Gruppe und stärker unpolar als OH sein. In Frage kommt R=O-Ester oder aber eine S-Substituent-Gruppierung (SH-Reagentien im Testmedium).

Schließlich ergaben auch dünnschichtelektrophoretische Untersuchungen keine Übereinstimmung mit den vorhandenen Vergleichssubstanzen.

Ob es sich bei der Substanz X um ein Zwischenprodukt der Ribonucleotidreduktase-Reaktion handelt, bleibt offen. Gegen die Existenz eines Zwischenprodukts spricht die Anhäufung dieser Substanz in größerer Menge bei Verwendung des Rohextrakts (S30). Andererseits ist sicher eine Veränderung in der 2'- (oder 3'-) Stellung der Ribose eingetreten, was die Vermutung stützt, daß ein Zusammenhang mit der Ribonucleotidreduktion vorhanden ist. Die oben erwähnten Möglichkeiten der chemischen Natur von R würden eine Zwischenproduktfunktion ebenfalls erlauben, da sie in jedem Fall eine bessere "leaving-group" als OH darstellen. Es ist auch zu bedenken, daß die meisten anderen Nucleotidmodifizierungsreaktionen nicht auf der Monomeren- sondern auf der Polymerenstufe ablaufen.

Angesichts der Bedeutung dieser Fragestellung ist eine endgültige Klärung notwendig. Dabei kann man wahrscheinlich durch das Angebot zusätzlicher radioaktiver Vorläufer ($^{14}\text{C-CH}_3$, ^{35}S) eine weitere Markierung von X in vivo erreichen oder über die Synthese von Modellverbindungen weitere Erkenntnisse erwarten. Solche Versuche können im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgeführt werden.

3.3. DNA-Polymerase aus *Vicia faba* und *Glycine max*

Chromatingebundene und lösliche DNA-abhängige DNA-Polymerasen sind Gegenstand einer relativ geringen Anzahl von Untersuchungen in Pflanzen. Dabei ließ sich die Aktivität der löslichen Enzyme viel besser mit der DNA-Replication in Einklang bringen als die der chromatingebundenen. So geht in keimenden Weizenembryonen dem Beginn der DNA-Synthese eine acht- bis zehnfache Aktivitätssteigerung der löslichen DNA-Polymerase voraus⁸⁹. In keimenden Erbsen fand man eine vierfache Aktivitätssteigerung dieses Enzyms zu Beginn der DNA-Synthese⁹⁰. Die hier beschriebenen Untersuchungen zur DNA-Synthese in *Vicia faba*-Wurzelspitzen und *Glycine max*-Suspensionskulturen erstrecken sich deshalb ebenfalls auf den Nachweis und die Charakterisierung der löslichen Enzyme. Für die Präparation wurden solche *Vicia faba*-Wurzelspitzen und Sojabohnenkulturen eingesetzt, die maximale Ribonucleotidreduktaseaktivität gezeigt hatten, d.h. 16 Stunden gekeimte Bohnensamen und Suspensionskulturen aus der logarithmischen Phase.

3.3.1. Nachweis und Zeitabhängigkeit

DNA-Polymeraseaktivitäten in eukaryontischen Zellen sind im Vergleich zu denen der Prokaryonten äußerst gering. Der Einbau eines radioaktiv markierten Desoxyribonucleosidtriphosphats in die säurefällbare Fraktion, der zur Bestimmung der Enzymaktivität Verwendung findet, wird erst durch Zugabe eines unverdünnten, trägerfreien Nucleotids (30 Ci/mMol) gut meßbar. Nach der allgemein gebräuchlichen Bestimmungsmethode⁹¹ werden die Nucleinsäuren durch Ansäuern der Testlösung gefällt und über Membran- oder Glasfaserfilter abgetrennt. Wir fanden bei Voruntersuchungen sehr große Schwankungen in der gemessenen Radioaktivität. Dafür kamen als Hauptursache unvermeidbare

Fehler beim Waschen des Filters in Frage, wofür es auch in der Literatur kein allgemein anwendbares Rezept gibt. Die Radioaktivität in der Testlösung beträgt das zehntausendfache der ausgefällten, in die DNA eingebauten Aktivität und es genügen nicht erkennbare Spuren, die erst mit der Waschlösung vom Rande der Fritte aufs Filter gelangen, um die Ergebnisse untragbar zu verfälschen. Um diese Fehler zu vermeiden, wurden 50 μ l-Proben direkt aus den Testlösungen auf Glasfaserfilter pipettiert und alle Tests einer Serie gemeinsam (maximal 24) in einem Filterwaschkorb (Filterwaschkorb nach Matthaei, Schleicher & Schüll, Dassel) in einer bestimmten Reihenfolge in Fällungs- und Waschlösungen gestellt (s.S.21). Dabei ergeben sich innerhalb einer Testreihe, und aber auch im Vergleich verschiedener Tests gut reproduzierbare Ergebnisse.

Zur Untersuchung der Polymeraseaktivität wurden Wurzelspitzen und Sojabohnenkulturen wie zur Untersuchung der Ribonucleotidreduktase beschrieben (s.S.37) aufgearbeitet. Aus S100-Überständen wurden Ammonsulfatfraktionen hergestellt, die dann nach Dialyse direkt eingesetzt wurden.

Für *Vicia faba* ergab sich auf Grund des mit dem Beginn der Keimung teilsynchron ablaufenden ersten Zellzyklus die Möglichkeit, den Aktivitätsverlauf über mehrere Stunden der Keimung zu verfolgen und zu sehen, ob eine Korrelation zum Ablauf der DNA-Vorläufer-Synthese nachweisbar ist. Zur Vermeidung von Unterschieden in der Qualität der Aufarbeitung wurden verschieden lange gekeimte Bohnensamen gleichzeitig mit den gleichen Reagentien behandelt. Vor allem wurde gleichzeitig in der selben Ammonsulfatlösung die Proteinfractionierung durchgeführt. Für die einzelnen Tests wurde die bei 30 - 70% Ammonsulfatsättigung ausfallende Proteinfraction verwendet.

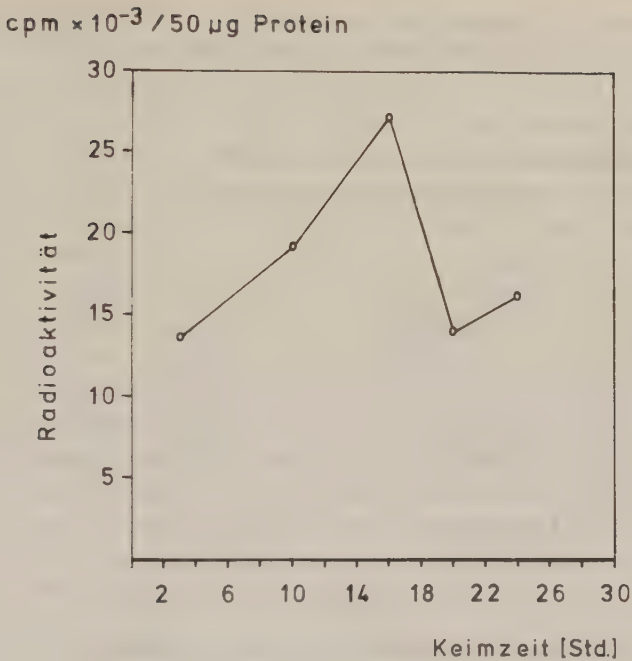


Abb. 8

DNA-Polymerase-Aktivität aus *Vicia faba* -Wurzelspitzen nach verschiedenen Keimzeiten/50 μ g Protein (Proteinkonz. 330 μ g/ml)

Es zeigte sich eine Verdopplung der spezifischen DNA-Polymerase-Aktivität nach 16 Stunden Keimzeit (+ 14 Stunden Wasseraufnahme), die auf ein Replicationsenzym schließen läßt. Die Aktivitätsveränderung verläuft analog den schon für die Ribonucleotidreduktion und in vivo-Markierung gefundenen Ergebnissen. Im Vergleich zu den Untersuchungen an Erbsen und Weizen ist der Effekt schwächer ausgeprägt.

Zur Charakterisierung der DNA-Polymerasen wurden die Ammonsulfatfraktionen auf 10%-Schritte verkleinert, um die spezi-

fische Aktivität noch weiter zu erhöhen. Unter Umständen läßt sich damit auch störende Desoxyribonuclease-Aktivität abtrennen⁹².

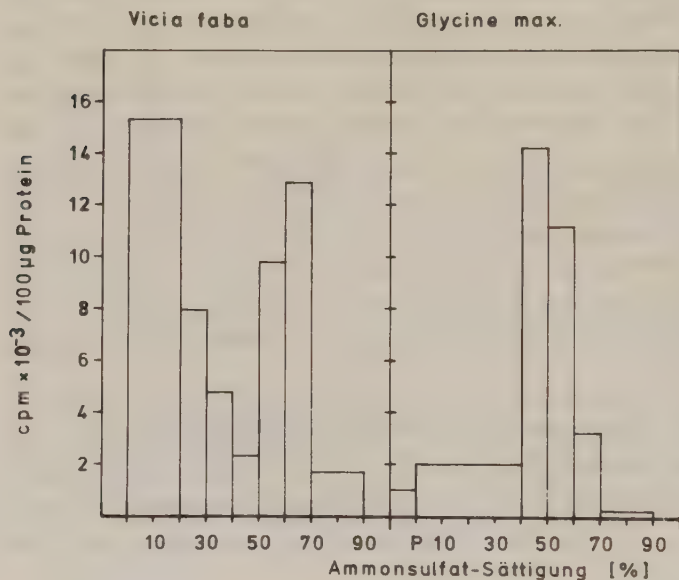


Abb. 9

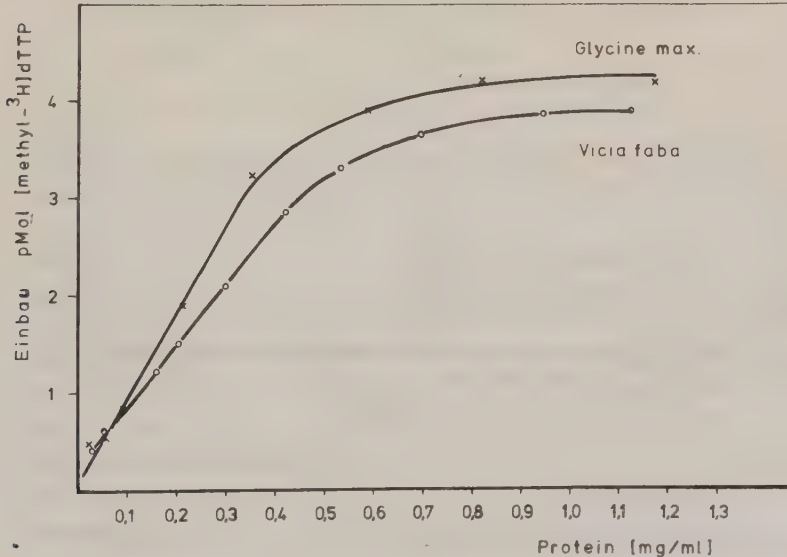
Ammonsulfatfraktionierung der DNA-Polymerase-Aktivität aus
Vicia faba-Wurzelspitzen, 16 Stunden gekeimt
Glycine max-Suspensionskulturen, log. Wachstumsphase

Die Vicia faba-Fraktionierung weist danach zwei Aktivitätsmaxima auf, zur weiteren Untersuchung wurde nur die Fraktion von 50 bis 70% Ammonsulfatsättigung verwendet. Aus der Glycine max-Fraktionierung wurde die Proteinfraction von 40 bis 60% Sättigung verwendet.

3.3.2. Eigenschaften und Spezifität der Enzyme

Der Einbau radioaktiver Vorläufer in DNA oder synthetische Polymere verläuft nur innerhalb eines kleinen Enzymkonzentrationsbereichs proportional zur vorhandenen Enzymkonzentration. Danach geht die anfangs lineare Abhängigkeit durch ein Maximum und fällt je nach Reinheitsgrad der Proteinfraction und Spezifität des Enzyms wieder ab. Teilgereinigte, käufliche Enzympräparationen aus *E.coli* zeigen bis 30 μg Protein/ml eine lineare Konzentrationsabhängigkeit, während die Aktivität bei einer Proteinkonzentration von 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf etwa 50% des Maximalwerts abgefallen ist. Die Polymerase I aus *E.coli* besitzt gleichzeitig Exo- und Endonucleaseaktivität, die diesen Effekt bewirken und seine Funktion als Reparaturenzym charakterisieren²³. Der Effekt kann aber auch durch andere Enzyme wie Desoxyribonucleasen hervorgerufen werden. Es ist deshalb unbedingt notwendig, vor Untersuchung der Enzymspezifität den linearen Bereich abzugrenzen.

Abb. 10



Abhängigkeit der (^3H)dTTP-Einbaurrate von der Proteinkonzentration

Der lineare Bereich erstreckt sich bei beiden Enzymen von etwa 50 bis 350 μg Protein/ml. Um den Bereich optimal auszunutzen, wurden die Tests in der Regel an der oberen Grenze mit 300 μg Protein/ml bzw. 30 bis 100 μg /Test durchgeführt

Für den Einbau von (^3H)dTTP in die säureunlösliche Fraktion benötigen beide Enzyme die Anwesenheit von DNA als Template. Bis zu einer Sättigungskonzentration von 100 μg DNA/ml erfolgt eine Zunahme der eingebauten Radioaktivität. Damit handelt es sich nicht um eine terminale Transferaseaktivität. Eine Desoxyribonucleotidyltransferase, wie sie zuerst in Kalbsthymus nachgewiesen wurde⁹³, benötigt kein Template und als Primer genügt eine kurze Oligodesoxynucleotidylkette von minimal drei Nucleotiden.

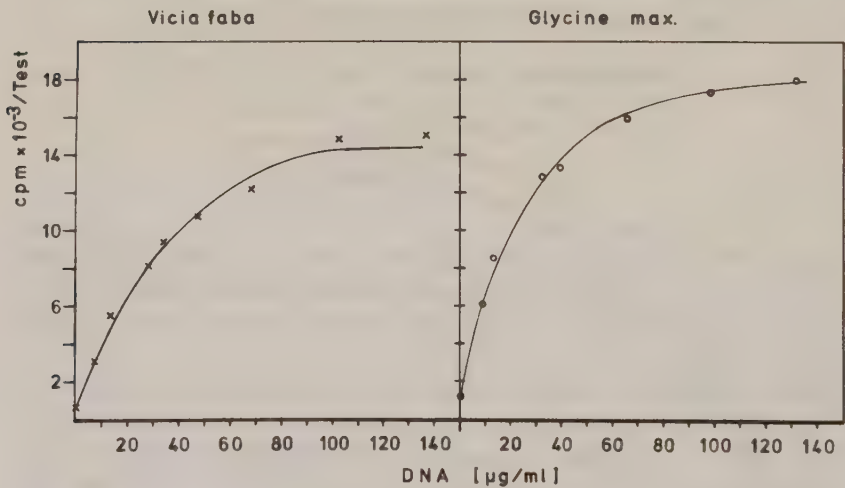


Abb. 11

Abhängigkeit der (^3H)dTTP-Einbaurrate von der DNA-Konzentration

Beide Enzymaktivitäten sind abhängig von Mg^{++} -Ionen. Der optimale Konzentrationsbereich liegt wie bei den meisten Enzymen bei 5 mM (Abb. 12, Tab. 8).

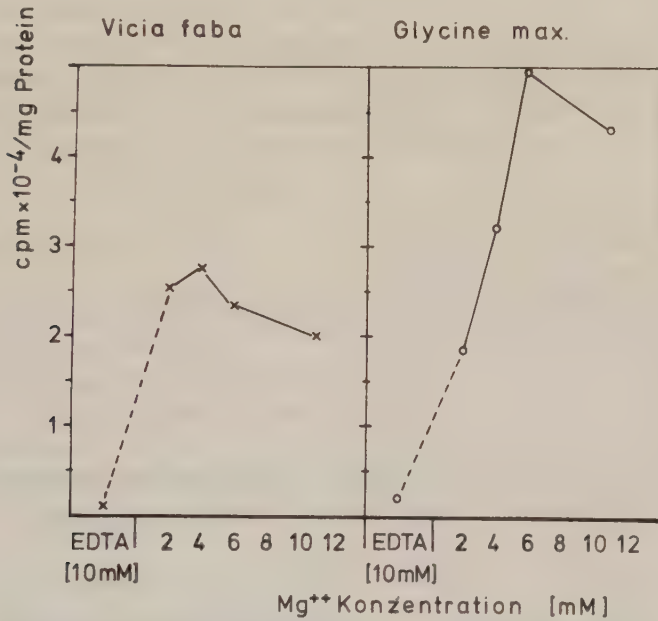


Abb. 12

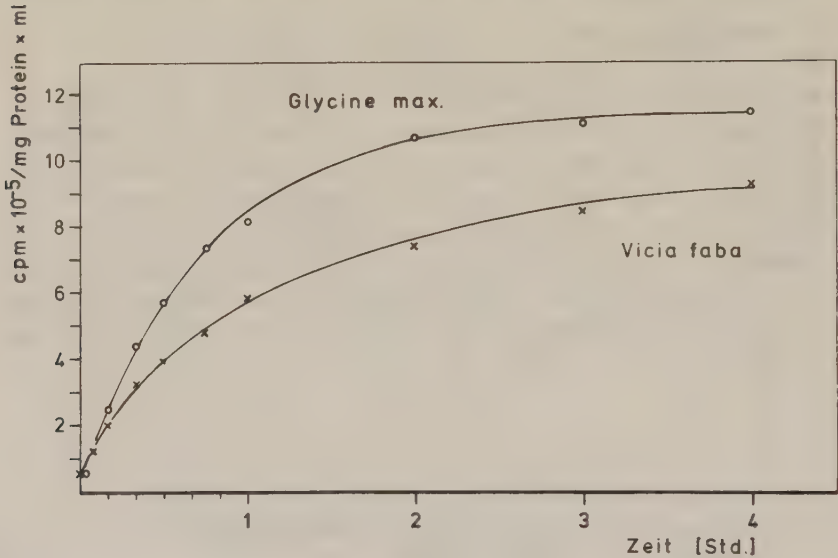
Abhängigkeit der DNA-Polymerase-Aktivität von der Mg^{++} -Ionen Konzentration (EDTA= 1 mM Mg^{++} + 10 mM EDTA)

Tab. 8

Aktivitätsmaximum

Herkunft	Chromatingebunden	Löslich	Literatur
Vicia faba	-	4 mM Mg^{++}	
Glycine max	-	6 mM Mg^{++}	
Pisum sativum	5 mM Mg^{++}	15 mM Mg^{++}	90
Beta vulgaris	5 mM Mg^{++}	-	94
Tradescantia paludosa	5 mM Mg^{++}	-	95
Triticum vulgare	-	4 mM Mg^{++}	89
Zea mays	-	5 mM Mg^{++}	96

Der Einbau von Radioaktivität in die säurefällbare Fraktion verläuft für etwa 1 Stunde linear und nimmt auch nach 4 Stunden noch weiter zu.



Kinetik des (³H)dTTP-Einbaus in die säureunlösliche Fraktion

Um die Spezifität der Enzyme zu testen, wurden verschiedene Templates eingesetzt: pflanzliche DNA, hochmolekulare-, hitzedenaturierte- sowie Desoxyribonuclease-aktivierte Thymus-DNA und Poly(dT,dA). Durch Hitzedenaturierung entstehen Einzelstränge, die eine größere Zahl von freien 3'-Enden haben als doppelsträngige DNA während Desoxyribonuclease I Behandlung zur Bildung von "nicks" führt⁹⁷. Ein nick ist definiert als Einzelstrangbruch einer DNA, der durch das Enzym DNA-Ligase, das nebeneinander liegende 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen verbindet, repariert werden kann. Eine große Zahl dieser nicks kann zur Fragmentierung der doppelsträngigen DNA

führen, wenn die Einzelstrangbrüche nicht weit voneinander entfernt auf gegenüberliegenden Seiten vorhanden sind. Die Bruchstücke haben dann herausragende 5'-Enden, die als Template für DNA-Polymerasen geeignet sind.

Zur weiteren Charakterisierung ist Actinomycin D eingesetzt worden. Bei der Bindung an DNA schiebt sich das Antibiotikum zwischen dG/dC-Basenpaare⁹⁸. Dadurch entsteht eine vollständige Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese und eine erhebliche Hemmung der DNA-abhängigen DNA-Synthese.

Tab. 9

(³H)dTTP-Einbau

Template	Vicia faba		Glycine max	
	cpm/Test	%	cpm/Test	%
Native DNA aus Weizenembryonen	1158	8	1365	10
Kalbsthymus-DNA, nativ	4498	29	2418	19
Kalbsthymus-DNA, hitzedenaturiert	6927	46	2692	22
Kalbsthymus-DNA, DNase-aktiviert	15000	100	12569	100
Poly(dT, dA)	10350	69	4400	35
Kalbsthymus-DNA, DNase-aktiviert/ + Actinomycin D (5 x 10 ⁻⁶ M)	6291	41	4815	38

Template-Aktivitäten für die Verwertung von (³H)dTTP bei der DNA-Polymerase-Reaktion

Schließlich muß kontrolliert werden, ob die in der säuregefällten Fraktion bestimmte Radioaktivität nur aus den (³H)dTMP Bausteinen der DNA stammt, obwohl ein Umbau des dTTP wenig wahrscheinlich ist. Zur Prüfung, ob das radioaktive Produkt insgesamt aus Desoxyribonucleinsäure besteht, können Resistenz gegen KOH und Ribonuclease (beide benötigen aus mechanistischen Gründen die 2'-OH-Gruppe für die Spaltung⁹⁹) sowie Abbau durch Desoxyribonucleasebehandlung als Kriterien gelten. Um diese Abhängigkeiten zu untersuchen wurde ein Aliquot der Reaktionslösung auf Glasfaserfilter pipettiert, gewaschen, ge-

trocknet und mit 200 μ l Reagentienlösung befeuchtet. Die Filter blieben in verschlossenen Präparategläsern über Nacht stehen. Nach einer Wiederholung des Waschvorgangs wurde am nächsten Tag die Radioaktivität ausgezählt.

Tab. 10

Behandlung	Vicia faba		Glycine max	
	cpm/Test	%	cpm/Test	%
- (Kontrolle)	8992	100	8040	100
+ 0,3 M KOH	7571	84	7400	92
+ RNase A	9032	100	8875	110
+ DNase I	275	3	713	9

Verhalten der Polymerisationsprodukte gegenüber KOH, Ribonuclease A und Desoxyribonuclease I

Für die Einordnung der beiden Pflanzen-Enzyme als Replicase, terminale Transferase oder Reparaturenzym ist es besonders aufschlußreich, die Abhängigkeit des (^3H)dTTP-Einbaus von der Anwesenheit der Desoxyribonucleosidtriphosphate zu untersuchen. Die Aktivität terminaler Transferasen ist sicher nicht von der Anwesenheit aller Triphosphate abhängig. Auch die Reparatur kleiner Lücken von 1 - 3 Nucleotiden läßt sich mit einem oder wenigen Vorläufern noch durchführen

Tab. 11

Reaktionsbedingungen	(^3H)dTTP-Einbauraten	
	Vicia faba	Glycine max
4 Triphosphate	100 %	100 %
- dATP	80 %	52 %
- dCTP	67 %	47 %
- dGTP	78 %	58 %
- dATP, dCTP	45 %	33 %
- dATP, dGTP	45 %	35 %
- dCTP, dGTP	49 %	34 %
- dATP, dCTP, dGTP	33 %	12 %

Nach Tab. 11 bleibt selbst in Gegenwart nur eines der vier Substrate 12 bis 33% des Maximalinbaus vorhanden, mit zwei Substraten 34 bis 45%, mit drei Substraten bis 80%. Diese Befunde zeigen unter den in vivo-Bedingungen eine hohe Reparaturkapazität der Enzyme an, während terminale Transferase ausgeschlossen werden kann.

3.4. Konkurrenzreaktionen

Ribonucleosiddiphosphate sind schon kurze Zeit nach ihrer Zugabe in die Reaktionslösung des Ribonucleotidreduktasetests (mit S30-Rohextrakten) in ein Gemisch von Mono-, Di- und Triphosphaten umgewandelt worden¹⁰⁰, das Verhältnis der einzelnen Phosphorylierungsstufen bleibt dann allerdings für eine Stunde relativ konstant. Bei der geringen Spezifität der in Pflanzen weit verbreiteten Phosphatasen kann man ein ähnliches Verteilungsmuster für die Abbaustufen der Desoxytriphosphate des DNA-Polymerasetests in Rechnung stellen. Um einen Überblick über die Vielfalt der in den Enzymtests störenden Umbaureaktionen zu erhalten, bietet sich die Bestimmung der sauren Phosphatase als ein "Leitenzym" für den Umfang des Substratabbaus an.

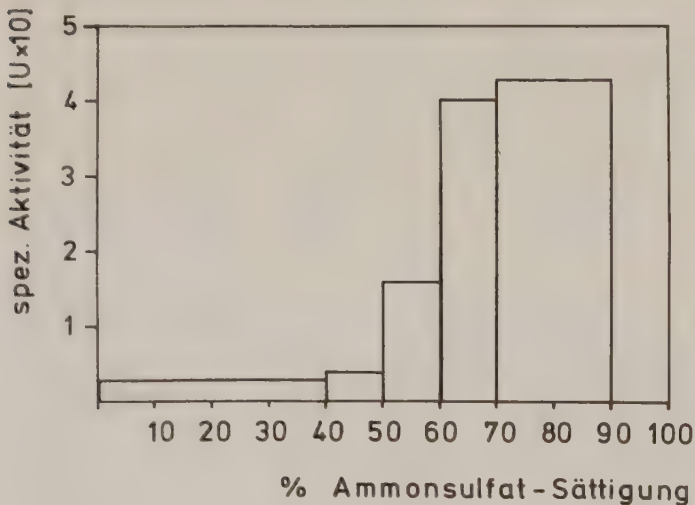


Abb. 14

Bestimmung der sauren Phosphatase in Ammonsulfat-Proteinfraktionen aus Glycine max, Citratpuffer pH 5,6, p-Nitrophenylphosphat als Substrat, 30°C.

Die sauren Phosphatasen selbst werden noch einmal nach ihrem pH-Optimum in drei Untergruppen eingeteilt; pflanzliche Phosphatasen arbeiten bevorzugt bei einem pH-Wert von etwa 5. Die Bestimmung der Phosphataseaktivität in *Vicia faba* und *Glycine max* wurde deshalb bei pH 5,6 durchgeführt, um Veränderungen der Enzymaktivität möglichst deutlich registrieren zu können. Bei diesem pH-Wert lagen die Umsätze um den Faktor 15 über denen, die unter Ribonucleotidreduktase- und DNA-Polymerasetest-Bedingungen, pH 7,4, erreicht wurden. Die oben beschriebenen Ribonucleotidreduktase- und DNA-Polymerasetests aus *Glycine max* waren zum großen Teil mit 10%-Ammonsulfatfraktionen durchgeführt worden. Im Bereich der maximalen Aktivität dieser beiden Enzyme (40 bis 60% Sättigung) ist die Phosphataseaktivität noch relativ gering.

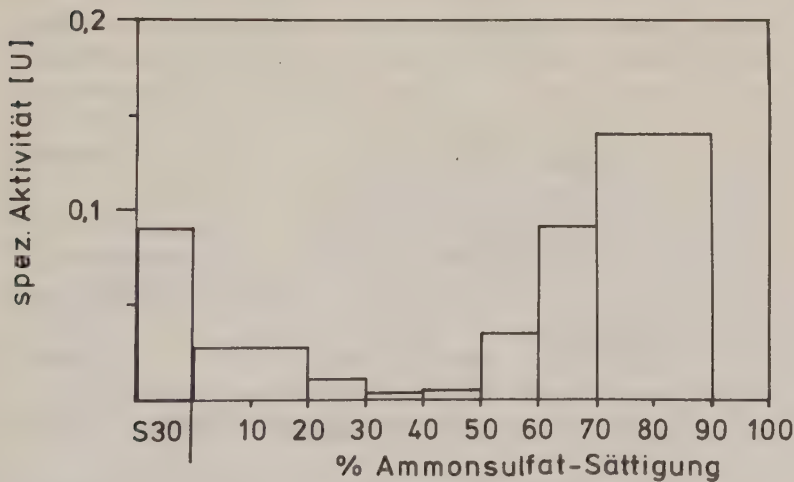


Abb. 15

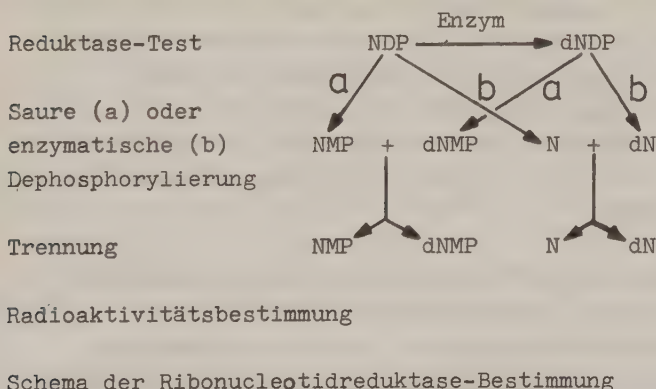
Bestimmung der sauren Phosphatase in Ammonsulfat-Proteinfraktionen aus *Vicia faba*-Wurzelspitzen, Citratpuffer, pH 5,6, p-Nitrophenylphosphat als Substrat, 30°C.

Ein ähnliches Bild zeigt sich in den *Vicia faba* Extrakten. Auch hier liegt zwischen der 40- und 90%-Fraktion eine 20- bis 25-fache Aktivitätssteigerung der Phosphatase.

Die vollkommene Abtrennung von Phosphatasen muß zwar das nächste Ziel bei der weiteren Reinigung von Ribonucleotidreduktasen und DNA-Polymerasen sein, für die vergleichenden Daten in dieser Arbeit wurde die Reduzierung der Phosphataseaktivitäten durch eine Ammonsulfatfraktionierung und pH-Wert als ausreichend erachtet.

4. Analytik der Ribonucleotidreduktase-Aktivität

Ribonucleotidreduktase-Aktivitäten sind stets sehr umständlich zu bestimmen, weil ihre Substrate und Produkte sich nur geringfügig in chemischen oder physikalischen Größen unterscheiden. Die direkte Messung der Enzymaktivität ist durch optische Bestimmung des NADPH-Verbrauchs möglich, wenn das physiologische Wasserstoffübertragungssystem, Thioredoxin und Thioredoxinreduktase in reiner Form vorhanden ist ¹⁰¹, oder bei den 5'-Desoxyadenosylcobalamin-abhängigen Ribonucleotidreduktasen durch die spezifische Tritium-Abspaltung vom 5'-³H-Coenzym ¹⁰². Die meisten der bakteriellen und tierischen Ribonucleosiddiphosphatreduktasen müssen in einem langwierigen, mehrstufigen Prozess analysiert werden. Ein radioaktiv markiertes Substrat wie (5-³H)CDP wird nach der enzymatischen Reaktion zusammen mit dem entstandenen Produkt entweder zum Monophosphat oder zum Nucleosid abgebaut. Danach ist eine Trennung von Substrat und Produkt notwendig, um den Anteil des Reduktionsproduktes zu erfassen:



Mittlerweile existiert eine große Anzahl verschiedener Trennverfahren, die auf Ionenaustausch-, Ionenausschluß- und Affinitätschromatographie sowie Papier- und Dünnschichtchromatographie beruhen.

In unseren Untersuchungen der Ribonucleotidreduktion in *Vicia faba* und *Glycine max*, aber auch bei entsprechenden Untersuchungen an Weizen wurden äußerst geringe Enzymaktivitäten gefunden ³⁹. Es war deshalb notwendig, entweder die bestehenden Bestimmungsmethoden zu verbessern oder empfindlichere zu entwickeln.

Während dieser Untersuchungen zur Analytik der Ribonucleotidreduktion stellte sich heraus, daß das Substrat (5-³H)CDP von der Herstellung her geringe Mengen (5-³H)dCDP enthielt. Dieses konnte mit einem einfachen Verfahren, das inzwischen auch in der Lieferfirma erprobt wird, vollkommen entfernt werden. Dazu wurde die Substratlösung auf ein "Boratgel" gegeben ^{103,104} und mit Triäthylammoniumcarbonat-Puffer pH 9,5 nachgewaschen. Nach der vollständigen Entfernung von dCDP konnte das zurückgehaltene CDP mit Wasser eluiert werden. So gereinigt enthielt es keine erkennbaren Spuren von dCDP mehr. Nach papierchromatographischer Analyse bestand es zu 95 % aus CDP und zu 5 % aus CMP. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen auch sehr geringe Umsätze im Bereich von 0,1 - 0,5 % zu erfassen, wenn das Trennverfahren es gestattet.

Für derartig empfindliche Trennungen reichen papierchromatographische Verfahren nicht aus. Die bis heute vorgeschlagenen papierchromatographische Methoden beruhen alle auf dem Trenneffekt, der durch die spezielle Komplexbildung der Borsäure mit cis-Glykol-Strukturen entsteht ^{105-107, 50}. Sie sind nur für qualitative Messungen brauchbar. Da die Zählmethode (Radiopapierchromatogrammscanner) nur etwa 2 %

der vorhandenen Tritiumaktivität wahrnimmt, lag die Nachweisgrenze bei 5000-10000 dpm. Es kam bei den Messungen zu hohem Untergrundrauschen, das zusammen mit den generell vorhandenen Fehlermöglichkeiten der Papierchromatographie (Zerfall der Substanz beim Aufsetzen, falsche Carrierzugabe, "Double-peaking" wegen Überladung des Papiers¹⁰⁸) den Einsatz dieser Methoden nur für qualitative Vorversuche erlaubt.

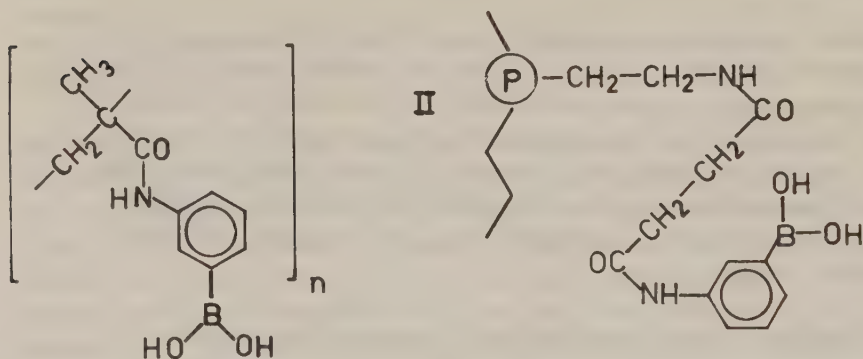
Papier- oder dünnschichtelektrophoretische Trennungen^{109,110} eigneten sich auch nicht für reproduzierbare quantitative Bestimmungen kleinster dCMP- oder dCyd-Mengen. Ein Grund ist wie bei der Papierchromatographie die geringe Zählausbeute der in Papier- oder Celluloseschicht verteilten Substanzen. Dazu kommen die geringen Ladungsunterschiede von CMP/dCMP mit 2,5/2,0 und von Cyd/dCyd mit 0,5/0 Ladungen in Boratpuffer, pH 9,2.

Im Gegensatz dazu bieten dünnschichtchromatographische Trennungen an PEI-Cellulose gute Unterschiede der Rf-Werte zwischen Ribo- und Desoxyribotidreihe. Nach grundlegenden Voruntersuchungen über die Herstellung und den Einsatz dieses Materials von Randerath folgten bald spezielle Verfahren, die alle auf der Komplexbildungsmöglichkeit mit Borsäure beruhen¹¹¹⁻¹¹³. Durch hohe Salzkonzentrationen (1-2 M LiCl) werden die Rf-Werte der Nucleotide vergrößert, so daß ein großer Trenneffekt erreicht werden kann. Die Platten lassen sich am Scanner quantitativ auswerten, wobei die untere Grenze wegen der geringen Zählausbeute allerdings bei etwa 2 % Produktbildung liegt¹¹⁴.

Für quantitative Analysen sehr geringer Ribonucleotid-reduktase-Aktivitäten bleiben nur säulenchromatographische Verfahren übrig, die grob nach ihrem Trennprinzip in drei Gruppen eingeordnet werden können: Ionenausschluß-, Ionen-

austausch- und Affinitätschromatographie.

Die affinitätschromatographisch verwendbaren Materialien haben wir zuerst auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht. Sie enthalten über einen Spacer an Cellulose (II) oder Methacrylat-Polymere (I) gebundene Dihydroxyboryl-Substituenten 115,103,104 und ergeben eine gute Gruppentrennung.



Substanzen ohne cis-Glykol-Struktur werden primär nicht zurückgehalten, Riboside können durch pH-Erniedrigung oder mit Boratlösung ¹¹⁶ eluiert werden. Aber diese Methoden, die ursprünglich für die Isolierung von tRNA aus RNA-Gemischen entwickelt worden waren, sind weniger brauchbar, wenn nicht (wie im Fall der tRNA) die zurückgehaltene Substanz gereinigt oder bestimmt werden soll sondern die durchgelaufene. Dann verfälschen nicht erkennbare Neben- oder Abbauprodukte, im einfachsten Fall ³H₂O oder die Nucleobasen, die Ergebnisse. In unserem Fall verhielt sich das Nebenprodukt X chromatographisch wie ein Desoxynucleotid. Dieser grundlegende Mangel, der durch das Gruppentrennungsprinzip entsteht, haftet auch den ionenaustauschchromatographischen Verfahren an, die die durch Komplexbildung mit dem Boronatanion bei pH 9,2 entstehende negative Teilladung zur

Bindung der Riboside an Dowex 1-Anionenaustauscher ausnutzen ^{117,118}. Auch hier bestand für unsere schwachen Reduktaseaktivitäten die Notwendigkeit einer erneuten Aufarbeitung des Durchbruchpeaks. Damit sind aber die Vorteile dieser Verfahren, Trenneffektivität und Schnelligkeit, verloren.

Es kann deshalb nicht verwundern, daß Reichards Originalverfahren ⁵⁰, Ionenausschlußchromatographie an Dowex 50WX2, auch heute noch als die zuverlässigste Methode angesehen werden muß. Daher wurden die quantitativen Ribonucleotid-reduktasebestimmungen trotz des sehr hohen Zeitaufwandes mit dieser Methode durchgeführt. Durch den Einsatz von Chromatographiesäulen mit äußerst geringen Totvolumen und nach dem Austesten des günstigsten Verhältnisses von Säulenhöhe zu Fließgeschwindigkeit ließen sich bis zu 0,1 % dCMP neben 5 - 10 μ Ci CMP reproduzierbar bestimmen. Die in der Originalvorschrift beschriebene nachfolgende Elution der Nucleoside wurde nicht routinemäßig übernommen. Sie ist sehr viel ungenauer und war für unsere Reduktasebestimmungen unbedeutend.

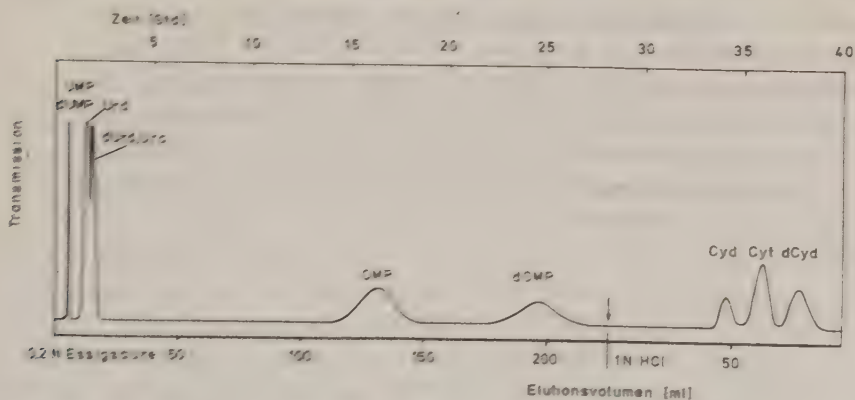


Abb. 16 Elutionsdiagramm der Uracil- und Cytosinderivate nach Reichard ⁵⁰ (0,2 M Essigsäure, ab Pfeil 1 N HCl)

Ein Trennungsdurchgang mit einer 25 x 0,9 cm Säule dauert bei der Fließgeschwindigkeit von 8 ml pro Stunde etwa 30 Stunden. Für Serienbestimmungen der Ribonucleotidreduktase-Aktivität galt es deshalb, diesen Zeitaufwand zu verkürzen ohne die Trennschärfe zu verringern.

Eine Halbierung der Zeit konnte schon mit dem stärker vernetzten Harz 50WX8 bei einer Säulenlänge von 25 x 0,6 cm erreicht werden. Die Reduzierung dieses Arbeitsgangs auf etwa 3 Stunden gelang mit dem außerordentlich feinkörnigen Harz Beckman M 71, das bei der automatischen Aminosäureanalyse und im Nucleosidanalysator Verwendung findet. Verantwortlich für diesen Effekt sind die Erhöhung des Vernetzungsgrades von 2 % auf 8 % und die Verringerung der Austauscherpartikelgröße von $37 - 74 \mu$ (400 - 200 mesh) der Dowex-Harze auf $8 \pm 2 \mu$ des Beckman-Austauschers. Obwohl bei den beiden Dowex-Harzen die gleichen Siebfractionen verwendet wurden und die Kapazität pro Gramm trockenem Austauscher gleich groß ist, liegt die Kapazität pro ml feuchtem Austauscher bei den 8 %-ig vernetzten Harzen mehr als doppelt so hoch, weil sie bei der Wasseraufnahme weniger an Volumen zunehmen. Mit dem ebenfalls 8 %-ig vernetzten Beckman-Harz konnte die Zeit für einen Trennungsdurchgang noch einmal wesentlich verkürzt werden, weil die Einstellung des Gleichgewichts an kleineren Partikeln und bei erhöhter Temperatur schneller erreicht wird und durch die einheitliche Partikelgröße ($8 \pm 2 \mu$) die zur Bandenverbreiterung beitragende "Eddy"-Diffusion¹¹⁹ vermieden werden kann.

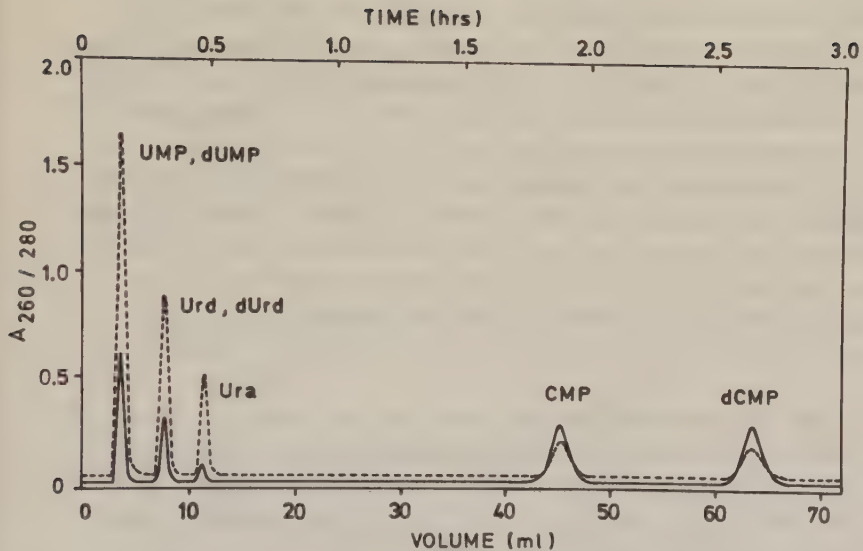


Abb. 17 Elutionsdiagramm der Uracil- und Cytosinderivate an Beckman M 71 (50 mM Ammoniumformiat-Puffer pH 3,0, Fließgeschwindigkeit 0,4 ml/min, aus⁶⁷)

Für die Durchführung benötigt man Pumpen, die 5 atü im Dauerbetrieb leisten, und eine besonders empfindliche UV-Registrierung wie sie mit der 50 μ l-Küvette von Uziel⁵² für den Nucleosidanalysator vorgeschlagen wurde.

Die Dephosphorylierung der Komponenten des Ribonucleotid-reduktasetests zu den Nucleosiden (Weg b) hat gegenüber der sauren Hydrolyse mehrere Vorteile. Sie kann auch mit säurelabilen Purinnucleotiden als Substrat angewendet werden. Ferner werden im Gegensatz zur Ionenausschlußchromatographie alle Nucleoside und Basen in einem Lauf von der Austausch-

säule eluiert. Für die Analyse eines solchen Reduktase-tests mit (5-³H)CDP haben wir deshalb den von Uziel et al. 1968 für die Analyse von Nucleosiden vorgeschlagenen Nucleosidanalysator eingesetzt. Die Austauschersäule mit Beckman M 71-Kationenaustauscher-Harz wird bei 50°C ständig mit 0,4 M Ammoniumformiat-Puffer pH 4,65 eluiert; sie braucht nicht regeneriert zu werden. Durch die große Kapazität des Austauschers werden die Substanzen in sehr kleinen Volumina eluiert, sie können an Hand ihres Elutionsvolumens (und ggf. des Quotienten $E_{280\text{ nm}}/E_{260\text{ nm}}$) identifiziert und durch Peakintegration quantitativ bestimmt werden. Die Meßanordnung geht auf ein Verfahren von Anderson¹²⁰ zurück.

Mit dem Nucleosidanalysator erhielten wir eine vollständige Trennung der Uracil- und Cytosinderivate mit Ausnahme von Cytosin selbst, das erst nach 4,5 Stunden erscheint. Es stört aber nicht, weil nach der Elution des Desoxycytidins bereits eine neue Analyse aufgesetzt werden kann. Diese Methode wird als derzeit beste Möglichkeit zur raschen Auftrennung von Reduktase-Tests empfohlen, wenn ein entsprechendes Gerät zur Verfügung steht. Im Rahmen meiner Arbeit konnte sie routinemäßig leider noch nicht angewandt werden.

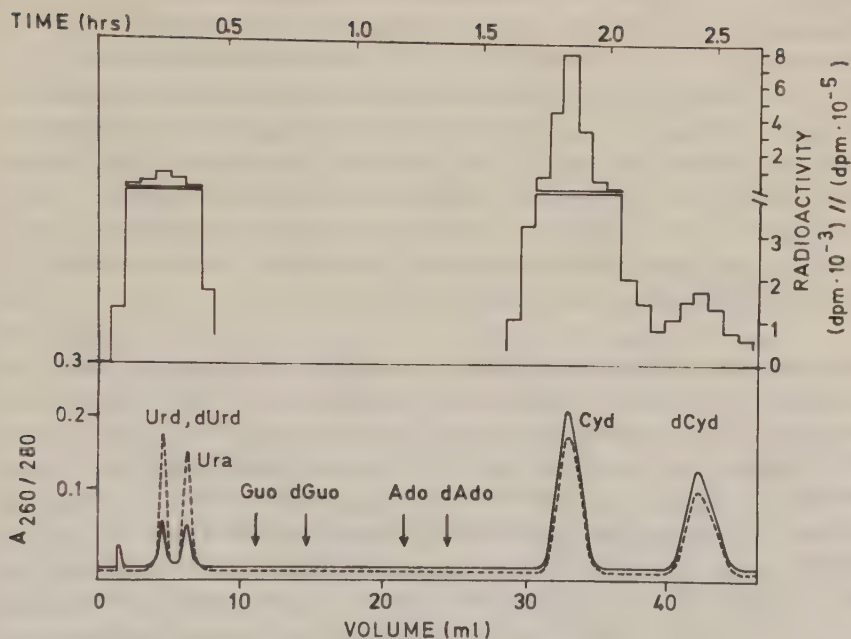


Abb. 18 Auftrennung der Nucleoside eines mit Phosphatase abgebauten Ribonucleotidreduktasetests, $(5\text{-}^3\text{H})\text{CDP}$ als Substrat, an Beckman M 71-Kationenaustauscher in einem Nucleosidanalysator. Elution mit 0,4 M Ammoniumformiat-Puffer pH 4,65

UV-Aufzeichnung: A_{260} - - - -, A_{280} ———

Eine mögliche Auftrennung der Purinnucleoside ist durch Pfeile gekennzeichnet ¹²¹.

Die beiden oben beschriebenen Verfahren, Ionenausschlußchromatographie der Nucleotide und Ionenaustauschromatographie der Nucleoside und Basen an Beckman M 71-Harz, sind im Zeitaufwand mit einem erst vor kurzer Zeit veröffentlichten

Konzept der Trennung von Nucleosiden und Basen durch Ionenausschlußchromatographie in Gegenwart von Ammoniumborat-Puffer pH 7,4 vergleichbar¹²². Von diesen drei Verfahren vereinigt die Nucleosidanalysatortrennung die meisten Vorteile. Sie ergibt neben einer klaren Gruppentrennung (dem Block der Uracilderivate folgt in weitem Abstand der der Cytosinderivate) eine gute Trennung der Einzelsubstanzen. Wegen der relativ hohen Ionenstärke des Elutionsmittels wird sie von wechselnden Salzmengen, die durch die Analysenlösung auf die Säule gelangen, nicht beeinflusst.

In einer gemeinsamen Veröffentlichung über die Analytik der Ribonucleotidreduktase-Reaktion beschreibt Follmann⁶⁷ schließlich die Verwendung eines Durchflußszintillationszählers zur Vereinfachung der Ribonucleotidreduktase-Tests. Wenngleich dieses System eine wassermischbare Szintillatorlösung wie Bray-Lösung mit ihren bekannten Nachteilen benötigt, läßt die Kombination von optimierter Säulentrennung und direkter Radioaktivitätsmessung in Zukunft eine wesentlich verbesserte Ribonucleotidreduktase-Bestimmung erwarten.

5. Diskussion

5.1 Die Ribonucleotidreduktion in Pflanzen

Ribonucleotidreduktase-Aktivität wurde in keimenden Ackerbohnen (*Vicia faba*) in vivo und in vitro und in Sojabohnen-Zellkulturen in vitro nachgewiesen. Außer diesen beiden sind bisher nur wenige andere pflanzliche Enzyme untersucht worden: Neben dem ersten Nachweis pflanzlicher Ribonucleotidreduktase-Aktivität in keimendem Weizen ³⁹ und der unveröffentlichten Beschreibung eines GDP reduzierenden Enzyms in 4 Tage alten Kalluszellen der Sojabohne ⁴¹ müssen die Ergebnisse an den Grünalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlorella pyrenoidosa* genannt werden ⁴². Zu der anderen Gruppe von Ribonucleotidreduktasen gehören die Coenzym B₁₂-abhängigen Reduktasen aus den Algen *Euglena gracilis* und *Astasia longa* ^{123,102}, aus mehreren blaugrünen Algen ¹²⁴ sowie dem Pilz *Pithomyces chartarum* ¹²⁵. Eine einfache Einteilung in Prokaryonten mit Coenzym B₁₂-abhängigen Enzymen und Eukaryonten mit Reduktasen, die Nicht-Häm-Eisen enthalten, ist offensichtlich nicht möglich. Andererseits scheint die Grenze des Vorkommens beider Enzymtypen zwischen blaugrünen Algen und *Euglena* sowie Grünalgen und höheren Pflanzen nunmehr gut dokumentiert. Beide hier untersuchten Enzyme müssen zu den für Eukaryonten typischen, ATP und Eisenionen benötigenden Proteinen gerechnet werden. Die Ribonucleotidreduktase aus *Vicia faba*-Wurzelspitzen akzeptiert CDP als Substrat, die Zugabe von Mg⁺⁺- und Eisen-Ionen scheint nicht notwendig zu sein. Allerdings entsteht durch den Eisenkomplexbildner Hydroxyharnstoff ein deutlicher Rückgang des Reduktionsprodukts. Als Ersatz für ein physiologisch wirksames Wasserstoffübertragungssystem war die Anwesenheit von DTT im Reduktasetest unbedingt notwendig. Schließlich zeigte sich mit Coenzym B₁₂ keine Veränderung des Umsatzes.

Absolut festlegen lassen sich die aufgeführten Eigenschaften von *Vicia faba*-Ribonucleotidreduktase deshalb noch nicht, weil erst eine höhere Anreicherung des Enzyms und die Abtrennung störender Aktivitäten sichere Ergebnisse liefern kann.

Erstaunlich ist der geringe Einfluß von Eisenionen. Möglicherweise liegt auch hier, wie bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* angenommen werden muß, eine sehr feste Eisen-Protein Bindung vor, die zwar durch zugegebene Eisensalze nicht beeinflußt wird, sich aber der Komplexbildung mit Hydroxyharnstoff nicht entziehen kann. Schon in Arbeiten von Odmark und Kihlman⁶³ konnte gezeigt werden, daß Hydroxyharnstoff und Desoxyadenosin die DNA-Synthese von *Vicia faba*-Wurzelspitzen in vivo weitgehend hemmen, die RNA Synthese aber kaum verändern. Da Desoxyadenosinbehandlung in vivo zur Anhäufung von dATP in den Zellen führt¹²⁶, andererseits Hydroxyharnstoff keine Wirkung auf Thymidinkinase, Thymidylatkinase und DNA-Polymerase hat¹²⁷, wurde auch dort der Rückgang der DNA-Synthese mit einer Hemmung der Ribonucleotidreduktase gedeutet. Coenzym B₁₂-abhängige Lactobacillus leichmanii-Reduktase zeigt keine Hemmbarkeit durch Hydroxyharnstoff¹²⁸. Damit erweist sich unsere in vitro nachgewiesene Verminderung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität durch Hydroxyharnstoff zusammen mit der Wirkungslosigkeit von Coenzym B₁₂ als wichtiges Entscheidungskriterium für die Einordnung dieses Enzyms in die Gruppe der Diphosphatreduktasen, die von den bis zur Homogenität gereinigten bakteriellen und tierischen Enzymen aus *E. coli*, aus Novikoff-Ascites-Tumorzellen und regenerierender Rattenleber repräsentiert werden¹⁸. Hinweise für einen membrangebundenen Zustand des Enzyms konnten nicht gefunden werden.

Ein Thioredoxinähnliches System für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten während der Ribonucleotidreduktion

existiert nach Untersuchungen von Wagner ¹²⁹ auch in Grünalgen. Extrakte aus Wurzelspitzen 16 Stunden gekeimter Ackerbohnen zeigten nach teilweiser Reinigung eine Enzymaktivität, die zusammen mit dem Überstand eines hitzenaturierten Extrakts die Reduktion von Bis(thionitrobenzoesäure) = Ellman's Reagenz katalysiert, doch wird dieser Thio-redoxintest durch Proteindisulfidreduktase maskiert. Der Beweis für das Vorliegen eines Vicia-Thio-redoxinsystems durch homologe in vitro-Experimente steht wegen der zu geringen Ribonucleotidreduktase-Aktivität noch aus.

Die Untersuchungen in *Vicia faba* wurden auf den ersten Zellzyklus mit seinem teilsynchronen Ablauf beschränkt. Es war naheliegend, daß eine vergleichsweise wenig aktive eukaryotische Ribonucleotidreduktase wegen des Verstärkungseffekts, der durch das synchrone Auftreten dieses induzierbaren Enzyms entsteht, im ersten Zellzyklus am leichtesten gefunden werden konnte. Denn die meristematischen Zellen in der Primärwurzel beginnen ihren ersten Teilungsdurchgang aus G₁ und durchlaufen S (die Periode der DNA-Synthese) teilsynchron. Dieser Ablauf zeigt sich in dem scharfen Peak bei der Untersuchung der DNA-Synthese über den Einbau radioaktiv markierter Vorläufer ⁶¹.

Wir fanden zur gleichen Zeit, die von Jakob und Bovey für den Beginn der DNA-Synthese angegeben wird, eine kurzzeitige Zunahme und Abnahme der Ribonucleotidreduktase-Aktivität mit dem Maximum bei 16 Stunden Keimzeit. Dieser Befund stimmt, obwohl er sehr schwach ausgeprägt ist, überein mit anderen Ergebnissen aus teilsynchron ¹³⁰ oder synchron ⁴² wachsenden Zellen.

Nach den Untersuchungen von Jakob ¹³¹ kann auch für *Vicia faba* davon ausgegangen werden, daß das embryonale Gewebe

einen relativ großen Anteil an maskierter mRNA enthält und eine frühe Proteinsynthese für den Verlauf der DNA-Synthese nötig ist. Cycloheximid inhibiert diese Proteinsynthese und verhindert damit auch die DNA-Neubildung. Der Vorgang der DNA-Synthese an sich wird aber nicht berührt, da Cycloheximid-Zugabe 1/2 Stunde vor der DNA-Markierung nur noch etwa 25 % Hemmung bewirkt und DNA-Polymerase bereits vorhanden ist. Um zu prüfen, ob auch die Induktion der Ribonucleotidreduktase durch Neusynthese des Proteins vollzogen wird oder ob sie durch Inhibitoren geregelt wird, untersuchten wir den Einbau von (5-³H)Cytidin über in vivo-Reduktion in *Vicia faba*-Wurzelspitzen (Tab. 3, S. 46).

Dieser in vivo-Einbau zeigte den gleichen, zeitabhängigen Verlauf mit einem Maximum bei 16 Stunden Keimzeit wie die in vitro-Bestimmungen der Reduktase. Cycloheximid führte auch dann zur Hemmung der DNA-Synthese, wenn es nur zur Zeit der Markierung und nicht während der gesamten Keimung zugegeben wurde. Damit wird ein Induktionsmechanismus über die Proteinneusynthese wahrscheinlich, obwohl die Wirkungsweise von Cycloheximid strittig ist. Es wird von MacDonald und Ellis ^{132,133} diskutiert, daß Cycloheximid die oxidative Phosphorylierung stört und in höheren Pflanzen die Proteinsynthese nicht nur über direkte Einwirkung an den Ribosomen sondern auch durch Blockierung der Energieübertragung gehemmt wird. Die Störung der ATP-Bildung könnte natürlich auch die Ribonucleotidreduktase-Aktivität erniedrigen. Den ATP-Spiegel haben wir aber mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Enzyms ¹³⁴ bestimmt. Wurzelspitzen 16 Stunden gekeimter *Vicia faba*-Samen zeigten nach 2-stündiger Cycloheximidbehandlung einen Rückgang des ATP-Gehalts auf 55 % des Normalwertes an. Danach liegt zwar ein Effekt des Cycloheximid auf die Atmung vor, aber das Ausmaß der ATP-Abnahme reicht nicht aus, um die Ribonucleotidreduktase durch ATP-(Effektor)-Mangel inaktiv zu machen. Also kann man die Abnahme der Ribonucleotidreduktion durch Cyclo-

heximid als ein Indiz für die Induzierung des Enzyms über eine Neusynthese werten.

Da die selbst angezogenen *Vicia faba*-Suspensionskulturen, wie auch von anderen Autoren in der Literatur beschrieben¹³⁵⁻¹³⁷ keine genügend hohe Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, wurden rascher wachsende Sojabohnen-Zellkulturen übernommen. Sie zeigten mit dem Standardtest Reduktase-Aktivität, die mit der in *Vicia faba* nachgewiesenen vergleichbar ist. Damit ist die Möglichkeit eröffnet, nach Entwickeln einer brauchbaren Synchronisierungsmethode Ribonucleotidreduktase höherer Pflanzen in größerem Maßstab zu isolieren.

Synchronisation kann über täglichen Temperaturwechsel, zeitlich begrenzten Entzug der C-Quelle, täglicher Unterbrechung der Zellatmung durch Stickstoffzufuhr¹³⁹ oder mit chemischen Mitoseinhibitoren wie 5-Amino-Uracil^{140,143} oder Hydroxyharnstoff¹⁴⁴ erreicht werden. Vorbedingung für die Anwendung solcher Synchronisationsmittel ist die Anlage einer durch kontinuierlichen Zulauf von Nährmedium andauernd in der exponentiellen Wachstumsphase gehaltenen Zellkultur¹⁴⁵. Die Lösung dieser neuen Aufgaben hätte jedoch den Rahmen meiner Arbeit gesprengt.

Mit der Isolierung und Charakterisierung von Ribonucleotid-reduktasen sind stets Probleme des Nachweises dieser Enzyme verknüpft, besonders wenn es sich - wie hier - um außerordentlich niedrige Enzymaktivitäten handelt, die sich an der Nachweisgrenze herkömmlicher Methoden bewegten. Anfängliche Schwierigkeiten konnten mit der Verbesserung des bekannten ionenausschlußchromatographischen Verfahrens⁵⁰ behoben werden. Außerdem wurde die Anwendbarkeit des Nucleosidanalysators für die Auftrennung eines dephosphorylierten Reduktasetestgemisches untersucht. Das Prinzip der ionenaustauschchromatographischen Trennung der Nucleoside und Nucleobasen erwies sich als sehr vorteilhaft. Gegenüber der Nucleosid- und Basentrennung von Pal, Regan und Hamilton¹²² muß man die Elution in Gruppen (zuerst Uracil-, dann Cytosinderivate) und innerhalb dieser Gruppen die klare Trennung von Nucleosid, Desoxynucleosid und Nucleobase hervorheben. Dadurch können Nebenprodukte der Reaktion direkt einer der vier Gruppen der Nucleinsäurebausteine zugeordnet werden. Es gibt eine wachsende Zahl der Substanzen, deren Elutionsvolumen und Extinktionsquotient auf dem Nucleosidanalysator bekannt ist; allein von Knipp¹³⁸ wurden die Analysatorwerte von etwa 200 Nucleosiden und Derivaten bestimmt. Diese Kenntnis wird solche Erkennungsprobleme auf wenige Möglichkeiten beschränken. Damit konnte eine Analysemöglichkeit gefunden werden, die 2 1/2 - 3 Stunden dauerte, eine sehr scharfe Trennung bewirkte und durch ihre robuste Reproduzierbarkeit eine Normierung der Elutionspositionen im Sinn der Aminosäureanalyse erlaubt. Ein Nachteil ist, daß spezielle Bauteile verfügbar sein müssen; daran lag es auch, daß die verbesserte Analytik im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt werden konnte.

Die Struktur eines auffälligen Neben- oder Zwischenprodukts des Ribonucleotidreduktasetests konnte als ein in der 2'- oder 3'-Stellung der Ribose modifiziertes Cytidinderivat bestimmt werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß sowohl in der Hefe als auch bei einem anderen Pilz (*Achlya*) Inhibitoren der Ribonucleotidreduktion gefunden wurden, die bisher noch nicht endgültig identifiziert wurden, aber für modifizierte Nucleotide oder Dinucleotide gehalten werden¹⁴⁶. Aber auch wenn sich X nicht als Zwischenprodukt oder Effektor der Ribonucleotidreduktion erweisen sollte, ist seine endgültige Strukturaufklärung wünschenswert, da das Auftreten modifizierter Nucleotide auf der Monomerenstufe selten ist; enzymatische Nucleotidmodifizierungsreaktionen laufen im allgemeinen nur an Polynucleotiden ab.

5.2. DNA-Synthese in Pflanzen

In Eukaryonten kann man neben den speziellen Enzymen der DNA-Replikation in Mitochondrien und Chloroplasten i. a. drei DNA-abhängige DNA-Polymerasen unterscheiden ^{27,33}. In höheren und niederen Pflanzen beschränken sich die Untersuchungen in der Regel auf die zwei Hauptenzyme, die dort meist als Polymerase A und B bezeichnet werden. Das Enzym B ist hauptsächlich im Kern anzutreffen, während das Enzym A vorwiegend cytoplasmatisch ist. Unter den Arbeiten an höheren Pflanzen geht bisher nur die Untersuchung an keimenden Erbsen ⁹⁰ auf beide Enzyme ein und vergleicht sie in einigen wenigen Punkten. Andere Arbeiten untersuchen Kernfraktionen ^{94,95} oder, wie auch in dieser Arbeit, den löslichen Überstand ^{89,96}. Die im löslichen Überstand anzutreffenden Polymerasen sind für den Replicationsvorgang nach dem Kriterium verantwortlich, daß sie während der DNA-Synthese an Aktivität zunehmen. In schnell wachsendem Gewebe macht die DNA-Polymerase der Mitochondrien etwa 1 % der Gesamtaktivität und die des Kerns 5 - 10 % aus. Deshalb haben wir uns auch für die Untersuchung der DNA-Polymerase in 16 Stunden gekeimten Wurzelspitzen der Ackerbohne und in Glycine max-Zellkulturen in exponentieller Wachstumsphase auf die Bestimmung der Enzyme aus dem löslichen Überstand beschränkt. Um die spezifische Aktivität in den Extrakten zu erhöhen, wurde eine Ammonsulfatfraktionierung vorgenommen, die bei der Aufarbeitung aus *Vicia faba* ein zweites Aktivitätsmaximum von bei geringer Salzkonzentration ausfallenden Proteinen ergab. Denkbar ist, daß es sich dabei um das gleiche Enzym handelt, das an DNA assoziiert schon bei geringer Salzkonzentration ausfällt.

Die Polymerase-Aktivität aus *Vicia faba* wurde auf ihre Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht. Mit aktivierter DNA als Template fand sich nach 16 Stunden Keimzeit eine Verdoppelung der Polymerase-Aktivität im Vergleich zu der nach drei Stunden Keimzeit. Der Anstieg ist damit zwar geringer

als bei Weizen oder Erbsen, die einen achtfachen bzw. vierfachen Anstieg zeigen, er fällt aber zeitlich genau mit den in vitro und in vivo-Testergebnissen der Ribonucleotid-reduktase-Aktivität zusammen. Damit ist hier in drei voneinander unabhängigen Experimenten der Zeitpunkt der ersten DNA-Synthese in diesem Gewebe bestimmt worden, ein vierter Befund sind die Experimente von Jakob et al⁶¹.

Die beiden untersuchten DNA-Polymerasen stimmen in ihrem Cofaktor- und Templatebedürfnis mit den bisher bekannten Enzymen aus höheren Pflanzen weitgehend überein. Sie zeigen beide eine lineare Konzentrationsabhängigkeit von etwa 50 µg - 350 µg Enzym/ml, beide benötigen für den Einbau von (³H)dTTP die Anwesenheit von DNA als Template, die bei etwa 100 µg DNA/ml ihre Sättigungskonzentration erreicht. Mg⁺⁺-Ionen stimulieren die Aktivität beider Enzyme, die optimale Konzentration liegt für Glycine max mit 6 mM und für Vicia faba mit 4 mM in dem Bereich des meistens mit 5 mM angegebenen Aktivitätsmaximums. Über die zeitliche Linearität der Polymerisationsreaktion werden sehr unterschiedliche Angaben gemacht, die wohl weitgehend vom Reinheitsgrad der Enzympräparation abhängen. Das Enzym aus keimenden Erbsen zeigt nur für 10 min Linearität, während die Polymerase aus Weizenembryonen für drei Stunden eine lineare Zunahme der DNA-Synthese ergibt. Die Enzyme aus Vicia faba und Glycine max arbeiten wie das aus Phaseolus aureus-Samen¹⁴¹ eine Stunde linear. Beide Enzyme sind nicht auf spezielle DNA angewiesen, sie zeigen aber eine beträchtliche Umsatzsteigerung, wenn statt nativer hitzedenaturierte oder Desoxyribonuclease-behandelte DNA eingesetzt wird. Auf Grund des Verhaltens der Polymerisationsprodukte gegenüber KOH, Ribonuclease und Desoxyribonuclease handelt es sich eindeutig und ausschließlich um eine DNA-abhängige DNA-Synthese.

Auffällig ist bei beiden Enzymen die relativ hohe Aktivität, die sie beim Fehlen einzelner oder mehrerer Triphosphate zeigen. Auch von Asciteszellen ist bekannt, daß bei Mangel an verschiedenen Triphosphaten noch deutlich Polymerase-Aktivität zu beobachten ist ¹⁴², jedoch werden in tierischen Zellen selten Werte von 60 bis 80 % mit drei der vier Desoxytriphosphate erreicht. Aber gerade bei Pflanzen ist dieser Effekt schon häufiger, wenn auch in schwächerer Form beobachtet worden. In *Tradescantia paludosa*-Pollen wird ohne dCTP noch 50 % der Radioaktivität des vollständigen Systems eingebaut ⁹⁵, in Maiskeimlingen liegt die Einbaurrate unter diesen Bedingungen bei 11%⁹⁶, aber in keimenden Erbsen ⁹⁰ bei 58 %. Gegen eine terminale Transferase-Aktivität spricht die 60 %-ige Hemmung mit Actinomycin D. Nicht zuletzt bewirkt die Desoxyribonuclease-Aktivierung des Templates Strangbrüche mit kurzen überstehenden 5'-Enden, die auch bei Mangel eines oder mehrerer Triphosphate zum großen Teil aufgefüllt werden dürften und ebenso den Effekt, der an sich auf Transferase Aktivität hinweist, vortäuschen könnten. Eine endgültige Klärung dieser Frage kann erst mit einer nearest neighbour-Analyse erreicht werden. Auf die DNase-Aktivierung kann wegen der geringen Enzymaktivität in Pflanzen nicht verzichtet werden.

Die DNA-abhängigen DNA-Polymerasen aus Wurzelspitzen 16 Stunden gekeimter Ackerbohnen und aus Sojabohnen-Zellkulturen im logarithmischen Wachstumsbereich zeigen in ihrem Verhalten bemerkenswerte Übereinstimmung. Obwohl man davon ausgehen muß, daß in diesen Wachstumsbereichen die eigentlichen Replikationsenzyme nur etwa 85 - 90 % der Gesamtaktivität darstellen, ergeben die aus den gemessenen Werten ablesbaren Eigenschaften eine erste Charakterisierung beider Enzyme.

6. Zusammenfassung

Ribonucleotidreduktase (EC 1.17.4.) und DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7.) sind zwei der wichtigsten Enzymsysteme bei der DNA-Replication, die - im Gegensatz zu Mikroorganismen oder Tieren - in höheren Pflanzen sehr wenig untersucht sind; besonders die Ribonucleotidreduktion kennt man bisher nur in Algen und im Weizen. In dieser Arbeit wurden beide Enzymaktivitäten in keimenden Samen der Ackerbohne *Vicia faba* und in Zellkulturen der Sojabohne *Glycine max* (Dicotyledoneae, Leguminosae) nachgewiesen und teilweise charakterisiert.

Die in *Vicia*-Wurzelspitzen, einem teilsynchronen Gewebe, zu beobachtende Ribonucleotidreduktase-Aktivität durchläuft um 16 Stunden nach Beginn der Keimung, d.h. kurz vor der DNA-Synthese, ein Maximum, doch bleibt die Enzymaktivität stets sehr gering. Ähnlich ließ sich die Ribonucleotidreduktion in rasch wachsenden (nicht-synchronen) *Glycine*-Suspensionskulturen nur während der logarithmischen Wachstumsphase zeigen. In vivo-Markierung der *Vicia*-DNA durch das Ribonucleosid (5-³H)Cytidin läßt etwa die gleiche zeitliche Zu- und Abnahme erkennen wie die in vitro bestimmte Ribonucleotidreduktase. Die starke Hemmung der in vivo-Markierung durch Cycloheximid weist darauf hin, daß Ribonucleotidreduktase vor der DNA-Synthese unter Neusynthese induziert wird.

Die in *Vicia* nachgewiesene Reduktase ist wahrscheinlich eine Ribonucleosiddiphosphatreduktase vom Typ der nicht-Häm-eisenhaltigen Enzyme aus *Escherichia coli*, Hefe oder Grünalgen (EC 1.17.4.1.), denn sie wird durch Hydroxyharnstoff gehemmt und durch ATP stimuliert. Als Reduktionsmittel kann Dithiothreitol fungieren. Möglichkeiten der Enzymanreicherung und der Abtrennung von Phosphatase-Aktivität wurden untersucht, doch konnte wegen der zu geringen Ausgangsaktivität noch keine Enzymreinigung durchgeführt werden.

Die Struktur eines in den Pflanzenextrakten aus (5-³H)CDP gebildeten Neben- oder Zwischenproduktes "X" der Ribonucleotidreduktion konnte bis auf die eines 2'- (oder 3'-)ribose-modifizierten Cytidinnucleotids eingegrenzt werden. Weitere Alternativen zur Aufklärung, Bildungsweise und Funktion dieser Substanz werden diskutiert.

Die hier isolierten DNA-Polymerasen aus *Vicia faba* und *Glycine max* sind lösliche, Mg^{++} -abhängige Enzyme, die eine aktivierte DNA als Matrizie benötigen und in vitro eine hohe DNA-Reparaturkapazität aufweisen. Sie werden mit den Enzymen anderer Pflanzen verglichen. Eine zeitliche Zunahme der DNA-Polymeraseaktivität in *Vicia faba* Wurzelspitzen um den Faktor 2 stimmt mit dem Zeitpunkt des von anderen Autoren durch in vivo Markierung gemessenen Beginns der DNA-Synthese überein.

Insgesamt stehen die hier untersuchten Eigenschaften von Ribonucleotidreduktion und DNA-Polymerisation in vitro und in vivo im Einklang mit Vorstellungen über den zeitlichen Ablauf synthetischer Prozesse in keimenden Pflanzenembryonen bzw. in der G₁- und S-Phase des Zellzyklus nach denen eine Proteinbiosynthese an (maskierter) mRNA der DNA-Biosynthese vorausgehen muß; unter den neusynthetisierten Proteinen sind auch Enzyme der DNA-Replication wie die Ribonucleotidreduktase.

Die Bestimmungsmöglichkeiten für sehr geringe Ribonucleotidreduktase-Aktivitäten mußten für die oben angegebenen Experimente optimiert werden. Es wurde eine neue Methode der säulenchromatographischen Trennung von Cytidin, Desoxycytidin und Cytosin sowie Uracilderivaten entwickelt, die sich durch einen verbesserten Trennfaktor und wesentlich verkürzte Analysenzeiten auszeichnet⁶⁷.

7. Literatur

- 1 Watson, J.D. (1975) The Molecular Biology of the Gene, third edition, W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park
- 2 Larsson, A. und Reichard, P. (1967) Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 7, 303
- 3 Blakley, R.L. und Barker, H.A. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 391
- 4 Moore, E.C., Hurlbert, R.B. (1962) Biochim. Biophys. Acta 55, 651
- 5 Nordenskjöld, B.A., Skoog, L., Brown, N.L. und Reichard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5360
- 6 Skoog, K.L., Nordenskjöld, B.A. und Bjursell, K.G. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 428
- 7 Liss, E., Brammer, S. und Schmidt, H. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 682
- 8 Hammarsten, E., Reichard, P. und Saluste, E. (1950) J. Biol. Chem. 183, 105
- 9 Rose, I.A. und Schweigert, B.S. (1953) J. Biol. Chem. 202, 635
- 10 Reichard, P., Baldesten, A. und Ruthberg, L. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1150-1157
- 11 Odmark, G. (1969) Physiol. Plant. 22, 161-170
- 12 Laurent, T.C., Moore, E.C., Reichard, P. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3436-3444
- 13 Moore, E.C., Reichard, P., Thelander, L. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3445-3452
- 14 Reichard, P. (1968) Eur. J. Biochem. 3, 259-266
- 15 Lewis, W.H., Wright, J.A. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 926
- 16 Blakley, R.L. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2173-2180
- 17 Follmann, H. (1974) Angew. Chem. 86, 624-634
- 18 Hogenkamp, H.P.C. und Sando, G. (1974) in Structure and Bonding, Springer Verlag, 20, 23-58
- 19 Larsson, A. und Reichard, P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2540-2549

- 20 Elford, H.L. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 537-543
- 21 Elford, H.L. (1973) Abstract, 9th IUB-Kongress, Stockholm
- 22 Kornberg, A. (1957) in The Chemical Basis of Heredity (W.D. McElroy and B. Glass, eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 579
- 23 Kornberg, A. (1974) DNA Synthesis, W.H. Freeman and Company, San Francisco
- 24 DeLucia, P. und Cairns, J. (1969) Nature 224, 1164-1168
- 25 Kornberg, T. und Gefter, M.L. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1348-1355
- 26 Kornberg, T. und Gefter, M.L. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5369-5375
- 27 Holmes, A.M., Johnston, I.R. (1975) FEBS Letters 60, 233-243
- 28 Weissbach, A. (1975) Cell 5, 101-108
- 29 Chang, L.M.S., Bollum, F.J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7948-7950
- 30 Chang, L.M.S., Brown, N. und Bollum, F.J. (1973) J. Mol. Biol. 74, 1-8
- 31 Spadari, S. und Weissbach, A. (1974) J. Mol. Biol. 86, 11-20
- 32 Craig, R.K., Costello, P.A. und Keir, H.M. (1975) Biochem. J. 145, 233-240
- 33 Bollum, F.J. (1975) in Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 15, 109-144
- 34 Smith, R.G. und Gallo, R.C. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2879-2884
- 35 Weissbach, A., Schlabach, A., Fridlender, B. und Bolden, A. (1971) Nature New Biology 231, 167-170
- 36 Foster, D.N. und Gurmey, T. (1974) J. Cell Biol. 63, 103a
- 37 Fansler, B. und Loeb, L.A. (1972) Expt. Cell Res. 75, 433-441
- 38 Fry, M. und Weissbach, A. (1973) Biochemistry 12, 3602-3608
- 39 Müller, H., Wahl, R., Kuntz, I. und Follmann, H. (1973) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 1299-1303

- 40 Odmark, G. (1971) *Physiol. Plant.* 25, 158-163
- 41 Cowles, J.R. und Guevara, J.G. (1973) *Plant Physiol.* 51, (Suppl.) 24
- 42 Feller, W. und Follmann, H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 752-758
- 43 Gamborg, O.L., Miller, R.A. und Ojima, K. (1968) *Exptl. Cell Res.* 50, 151-158
- 44 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, F.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 45 Giles, K.W. und Myers, A. (1965) *Nature* 206, 93
- 46 Burton, K. (1956) *Biochem. J.* 62, 315
- 47 Wyatt, G.R. (1951) *Biochem. J.* 48, 584
- 48 Lawley, P.D. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 21, 481
- 49 Neu, H.C. und Heppel, L.A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2927-2934
- 50 Reichard, P. (1958) *Acta Chem. Scand.* 12, 2048
- 51 Straat, P.A., Ts'o, P.O.P. und Bollum, F.J. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5000-5006
- 52 Uziel, M., Koh, C.K. und Cohn, W.E. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 77-98
- 53 Gassen, H.-G. und Leifer, W. (1970) *Z. Anal. Chem.* 252, 337
- 54 Loeb, L.A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1672-1681
- 55 Bessey, O.A., Lowry, O.H. und Brock, M.J. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 321
- 56 Koblitz, H. (1972) *Zell- und Gewebezüchtung bei Pflanzen*, G. Fischer Verlag, Stuttgart
- 57 Street, H.E. (1973) *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell Scientific Publications, Oxford
- 58 Müntz, K., Horstmann, C. und Scholz, G. (1972) *Kulturpflanze* 20, 277-326
- 59 Brauer, I. (1949) *Planta* 36, 411-423

- 60 Müller, H. Dissertation, in Vorbereitung
- 61 Jacob, K.M. und Bovey, F. (1969) Expt. Cell Res. 54, 118-126
- 62 Brunori, A. (1971) Caryologia 24, 209-215
- 63 Kihlman, B.A., Erikson, T. und Odmark, G. (1966) Hereditas 52, 386-397
- 64 Evans, G.M., Rees, H. (1971) Nature 233, 350-351
- 65 Davidson, D. (1966) Amer. J. Bot. 53, 491-495
- 66 King, T.P. (1972) Biochemistry. 11, 367-371
- 67 Hovemann, B. und Follmann, H. (1977) Anal. Biochem., im Druck
- 68 Berglund, O. und Eckstein, F. (1972) Eur. J. Biochem. 28, 492-496
- 69 Hoffmann, P.J. und Blakley, R.L. (1975) Biochemistry 14, 4804
- 70 Yamada, R.H. und Hogenkamp, H.P.C. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6266
- 71 Heyne, W. (1975) Staatsexamensarbeit, Marburg
- 72 Hahlbrock, K. und Kuhlen, E. (1972) Planta 108, 271-278
- 73 Hahlbrock, K. (1975) Planta 124, 311-318
- 74 Cowles, J.R. (1975) persönliche Mitteilung
- 75 MacLeod, R.D. (1973) New Phytol. 72, 259-267
- 76 MacLeod, R.D. (1971) Ann. Bot. 35, 237
- 77 Ennis, H.L. und Lubin, M. (1964) Science 146, 1474
- 78 Lonberg-Holm, K.K. (1967) Nature, 213, 454-457
- 79 Cantoni, G.L. und Davies, D.R., eds., Procedures in Nucleic Acid Research, Vol. 2, Harper & Row, Publishers, New York 1971
- 80 Fraser-Reid, B., Radatus, B. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 6342
- 81 David, S., Rouzeau, C. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 46

- 82 Verheyden, J.P.H., Moffat, J.G. (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 1236
- 83 Neu, H.C. und Heppel, L.A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2927-2934
- 84 Kopka, K. (1976) pers. Mitteilung
- 85 Gray, M.W. (1975) Can. J. Biochem. 53, 735-746
- 86 Guthrie, R.D. (1961) Adv. Carbohydr. Chem. 16, 105
- 87 Randerath, K. und Randerath, E. (1964) J. Chromatog. 16, 111-125
- 88 Randerath, K. und Randerath, E. (1967) in Methods in Enzymology (Grossman, L. und Moldave, K., eds.) Academic Press, New York 12 A, 323
- 89 Mory, Y.Y., Chen, D. und Sarid, S. (1974) Plant Physiol. 53, 377-381
- 90 Robinson, N.E. und Bryant, J.A. (1975) Planta 127, 69-75
- 91 Lehman, I.R., Bessman, M.J., Simms, E.S. und Kornberg, A. (1958) J. Biol. Chem. 233, 163
- 92 Mory, Y.Y., Chen, D. und Sarid, S. (1975) Plant Physiol. 55, 437-442
- 93 Kato, K., Convalves, J.M., Houts, G. und Bollum, F.J. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2780-2789
- 94 Dunham, V.L., Cherry, J.H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 403-410
- 95 Wever, G., Takats, S.T. (1970) Biochim. Biophys. Acta 199, 8-17
- 96 Stout, E.R., Arens, M.Q. (1970) Biochim. Biophys. Acta 213, 90-100
- 97 Anfinsen, C.B., Cuatrecasas, P. und Taniuchi, H. (1971) in The Enzymes, Academic Press, New York (P.D. Boyer, Ed.) 4, 177
- 98 Sobell, H.M. und Jains, S.C. (1972) J. Mol. Biol. 68, 21
- 99 Gassen, H.G. und Witzel, H. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 36
- 100 Feller, W. (1975) Diplomarbeit, Marburg
- 101 Holmgren, A., Reichard, P. und Thelander, L. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 830-836
- 102 Gleason, F.K. und Hogenkamp, H.P.C. (1972) Biochem. Biophys. Acta 277, 466-470

- 103 Schott, H., Rudloff, E., Schmidt, P., Roychoudhury, R. und Kössel, H. (1973) Biochemistry 12, 932-938
- 104 Schott, H. (1972) Angew. Chem. 84, 819-820
- 105 Fujioka, S. und Silber, R. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1688-1693
- 106 Vanderheiden, B. S. (1968) Anal. Biochem. 22, 231-237
- 107 Jacobson, K. B. (1964) J. Chromatog. 14, 542-543
- 108 Sheppard, J. in The Radiochromatography of Labelled Compounds, The Radiochemical Centre, Amersham, Review 14
- 109 Smith, J. D. (1967) in Methods in Enzymology (Grossman, L. und Moldave, K., eds.) Academic Press, New York 12 A, 350-361
- 110 Randerath, K. (1965) in Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim, S. 82-86
- 111 Schrecker, A. W., Jacobsen, D. W., Kirchner, J. (1968) Anal. Biochem. 26, 474-477
- 112 Yeh, Y.-C. und Tessman, I. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3252-3254
- 113 Rossi, M. und de Petrocellis, B. (1975) Anal. Biochem. 64, 367-371
- 114 Wagner, W., pers. Mitteilung
- 115 Moore, E. C., Peterson, D., Yang, L. Y., Yeung, C. Y. und Neff, N. F. (1974) Biochemistry 13, 2904-2907
- 116 Moore, E. C., pers. Mitteilung
- 117 Cory, J. G., Russel, F. A. und Mansell, M. M. (1973) Anal. Biochem. 55, 449-456
- 118 Steeper, J. R. und Steuart, C. D. (1970) Anal. Biochem. 34, 123-130
- 119 Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1974) in Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons, New York
- 120 Anderson, N. G. (1962) Anal. Biochem. 67, 625-633
- 121 Sprinzl, M., pers. Mitteilung
- 122 Pal, C. B., Regan, J. D. und Hamilton, F. D. (1975) Anal. Biochem. 67, 625-633

- 123 Hamilton, F.D. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4428-4434
- 124 Gleason, F.K., Wood, J.M. (1976) Science 192, 1343-1344
- 125 Stutzenberger, F. (1974) J.Gen.Microbiol. 81, 501-503
- 126 Odmark, G. und Kihlman, B.A. (1965) Mutation Res. 2, 274-286
- 127 Young, G.W. und Hodas, S. (1964) Science 146, 1172-1174
- 128 Elford, H.L. (1968) Biochem.Biophys.Res.Comm. 33, 129-135
- 129 Wagner, W., Dissertation, in Vorbereitung
- 130 Lowdon, M. und Vitols, E. (1973) Arch.Biochem.Biophys. 158, 177-184
- 131 Jakob, K.M. (1972) Expt.Cell Res. 72, 370-376
- 132 Ellis, R.J. und MacDonald, I.R. (1970) Plant Physiol. 46, 227-232
- 133 MacDonald, I.R. und Ellis, R.J. (1969) Nature 222, 791-792
- 134 Kimmich, G.A., Randles, J. und Brand, J.S. (1975) Anal.Biochem. 69, 187-206
- 135 Venketeswaran, S. (1962) Phytomorphology 12, 300-306
- 136 Grant, M.E. und Fuller, K.W. (1968) J.Exptl.Bot. 19, 667-680
- 137 Mitchell, J.P. und Gildow, F.E. (1975) Physiol.Plant. 34, 250-253
- 138 Knipp, H. (1972) Diplomarbeit, Münster
- 139 Kurz, W.G.W., Constabel, F. (1974) 3rd International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Leicester
- 140 Jakob, K.M. und Trosko, J.E. (1965) Exptl.Cell Res. 40, 56-67
- 141 Schwimmer, S. (1966) Phytochemistry 5, 791-794
- 142 Tsuruo, T. und Ukita, T. (1975) J.Biochem., Tokyo, 77, 863-866
- 143 Rudolph, J.M. und Davidson, D. (1975) New.Phytol. 74, 277-286

- 144 Adams, R.L.P. und Lindsay, J.G. (1967) J.Biol.Chem. 242, 1314-1317
- 145 Kurz, W.G.W. (1973) in Tissue Culture, Methods and Applications, Academic Press, New York & London, p.359
- 146 Lewis, W.H., McNaughton, D.R., LéJohn, H.B. und Wright, J.A. (1976) Biochem.Biophys, Res. Commun. 71, 128-133

Mein Dank gilt Herrn Prof. H.Follmann,

zahlreiche Diskussionen und sein persönliches
Engagement haben wesentlich zum Fortgang dieser
Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

28. August 1947	geboren in Bad Rothenfelde als Sohn des Oberamtmanns Alois Hovemann und seiner Ehefrau Maria geb. Olliges
1954-1958	Besuch der Volksschule in Münster
1958-1967	Besuch des Staatlichen Gymnasiums Paulinum (altsprachl. Gymn.) in Münster (Westf.)
03. Juli 1967	Ablegung der Reifeprüfung
WS 1967 - SS 1973	Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
17. Oktober 1969	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
29. September 1972	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
August 1971 - September 1972	Anfertigung der Diplomarbeit - Untersuchungen zur Stereochemie der Umesterung bei der Ribonuclease-Reaktion - im Institut für Biochemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel
WS 1973 - WS 1976	Studium der Chemie an der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
Dezember 1973 - Oktober 1976	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann in der Abteilung Biochemie des Chemischen Instituts
seit August 1972	verheiratet mit Mechthild Rodeck

